



Etude du rôle joué par les porines dans la persistance des infections par *Providencia stuartii*

Chady Nasrallah

► To cite this version:

Chady Nasrallah. Etude du rôle joué par les porines dans la persistance des infections par *Providencia stuartii*. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENY001 . tel-01346736

HAL Id: tel-01346736

<https://theses.hal.science/tel-01346736>

Submitted on 19 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Chady NASRALLAH

Thèse dirigée par **Martin WEIK** et **Jacques-Philippe COLLETIER**

préparée au sein de l'**institut de Biologie Structurale**
dans l'**École Doctorale de Physique**

Étude du rôle joué par les porines dans la persistance des infections par *Providencia* *stuartii*

Thèse soutenue publiquement le **28 Janvier 2014**,
devant le jury composé de :

M. Michel VIVAUDOU

Directeur de recherche-CEA, Institut de Biologie Structurale, Président

Mme. Isabelle BROUTIN

Directeur de recherche-CNRS, Université Paris Descartes, Rapporteur

M. Daniel LEVY

Directeur de recherche-CNRS, Institut Curie, Rapporteur

M. Jean-Marie PAGES

Directeur de recherche-INSERM, Université Aix-Marseille, Examineur

M. Mathias WINTERHALTER

Professeur-Université Jacobs, Examineur

Mme. Andrea DESSEN

Directeur de recherche-CNRS, Institut de Biologie Structurale, Examineur

M. Martin WEIK

Directeur de recherche-CEA, Institut de Biologie Structurale, Directeur de thèse

M. Jacques-Philippe COLLETIER

Chargé de recherche-CNRS, Institut de Biologie Structurale, Directeur de thèse



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury : Dr. Isabelle Broutin, Dr. Daniel Levy, Prof. Mathias Winterhalter, Dr. Jean-Marie Pagès, Dr. Andrea Dessen et Dr. Michel Vivaudou, de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Je tiens à remercier Prof. Eva Pebay Peyroula, la directrice de l'Institut de Biologie Structurale, de m'avoir donné l'opportunité de préparer cette thèse au sein de l'institut et pour ces conseils au cours des entretiens annuels.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr. Martin Weik, le directeur du groupe de recherche: Dynamique et cinétique des processus moléculaires, de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci Martin pour ton écoute et tes encouragements dans les moments difficiles mais surtout pour ta bonne humeur et les discussions scientifiques agréables que j'ai pu partager avec toi.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude au Dr. Jacques Philippe Colletier de m'avoir encadré durant ces trois années de thèse. Jacques, tu m'a donné l'opportunité de démarrer un sujet sous ta direction. Je te remercie particulièrement pour toute l'étendue de ton savoir que tu as su me transmettre durant cette période. Je suis très reconnaissant de ton soutien et de ta présence dans les moments difficiles. Je te remercie également pour ton investissement, tes précieux conseils et surtout ta patience lors de la rédaction de ce manuscrit. Je n'aurai jamais pu réaliser ce travail sans toi. Un grand merci du fond de mon cœur pour tout.

J'aimerais ensuite remercier toutes les personnes avec qui nous avons collaboré pour mener à bien ce projet de thèse. En Allemagne, l'équipe du Pr. Mathias Winterhalter ; A Marseille, l'équipe du Dr. Jean-Marie Pagès ; En Angleterre, Dr. Arthur Laganowski, En chine, l'équipe du Pr. Yechun Xu ; A Marcoule, l'équipe du Dr. Jean Luc Pellequer et à Grenoble, la plateforme de microscopie électronique sous la direction du Dr. Guy Schoehn et avec l'aide de Benoit Gallet et Daphna Fenel ainsi que la plateforme de spectroscopie de masse sous la direction de Luca signor.

Je remercie également Hind Basbous et Salif Yirampo, pour leurs contributions appréciées au projet au cours de leurs stages de Master. Un grand merci à Mathilde Lethier et Virginia Guillon pour le soutien et l'aide qu'elles ont apportés à ce projet.

Je tiens également à remercier tous les personnes avec qui j'ai partagé des discussions scientifiques fructueuses au sein de l'IBS, plus particulièrement Dr. Cécile Breyton, Dr. Françoise Lacroix , Dr. Jean Philippe Kleman, Katia Moeiseeva et Delphine Blot.

Une pensée à tous mes compatriotes libanais que j'ai fait connaissance à l'IBS, plus particulièrement, Christine Hajjar, Ali Flayhan, Ziad Ibrahim, Rida Awad, Hind Basbous et Mariam el Khatib. Veuillez toujours à transmettre la meilleure image de notre joli pays le Liban à l'étranger. En espérant que la stabilité règne de nouveau dans ce pays, je vous souhaite plein de succès dans votre avenir professionnel et personnel.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire avec qui j'ai partagé d'agréables moments et particulièrement: Mylène Ferruit, Alexandre Apolaire, Mathilde Lethier, Florand Bernaudat, Cyril Dyan, Aline Le Roy, Gianluca Santoni, Yann Fichou, Celine Lafaye, Virginia Guillon, Francesca Coscia et Giorgio Schirò. Cher amis, c'est vous tous qui m'avait fait aimé la vie au laboratoire. Je vous souhaite bonheur et réussite.

Je tiens également à remercier mes deux frères que j'ai fait connaissance à Grenoble, Joseph Kortbawi (Zouz) et Joe Youssef (Joey) qui m'ont toujours soutenu et particulièrement lors de la rédaction de ma thèse. Merci pour votre présence les colocs.

Un grand merci à Pauline Alberto et Yoann Lafaye qui ont passé de nombreuses heures à relire des parties de ma thèse et corriger les fautes d'orthographes.

Enfin, je remercie ma famille, qui malgré la distance, était toujours présente pour m'encourager et me soutenir. Je remercie plus particulièrement mes parents, Walid et Lamia ainsi que ma sœur Maguy et mon frère Bernard, sans qui rien de ceci n'aurait pu être réalisable.

En conclusion, c'est avec beaucoup d'émotions que je quitte l'Institut de Biologie Structurale. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous les personnels de l'institut, qui ont su rendre ces années très agréables et très enrichissantes autant d'un point de vue scientifique que personnel.

A mes très chers parents

Sommaire

Introduction	11
I- Introduction générale.....	12
II- L'alarmante résistance des bactéries aux antibiotiques	13
II-1: L'histoire des antibiotiques.....	13
II-2: L'enveloppe des bactéries, une barrière sélective aux antibiotiques	14
II-2.1: La membrane des bactéries à Gram-négatif, une barrière lipidique	15
II-2.2: La membrane des bactéries à Gram-négatif, une barrière protéique	16
II-2.3: Interactions entre LPS et porines, exemple LPS-FhuA	17
II-3: Les différentes classes d'antibiotiques	18
II-4: Cibles des antibiotiques	19
II-5: La résistance aux antibiotiques	24
II-6: L'émergence des bactéries multi-résistantes.....	24
II-7: Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	26
II-7.1: Inactivation des antibiotiques par des enzymes	26
II-7.2: Modification de la cible des antibiotiques	27
II-7.3: Réduction de la concentration intracellulaire des antibiotiques	27
II-8: Architecture des porines	28
II-9: Régulation de l'expression des porines	29
II-10: Évolution des porines	30
II-11: Rôle des porines dans la signalisation transmembranaire.....	30
II-12: Implication des porines dans la résistance aux antibiotiques.....	31
II-13: Études fonctionnelles	33
II-14: <i>Providencia stuartii</i>, l'organisme d'étude.....	33
II-14.1: La famille des entérobactéries	33
II-14.2: Les infections nosocomiales	34
II-14.3: Le genre <i>Providencia</i>	34
II-14.4: Mécanismes de résistance associés à <i>Providencia stuartii</i>	35
II-14.5: Rôle des porines de <i>P. stuartii</i> dans la résistance aux antibiotiques	35
II-14.6: Études fonctionnelles des porines de <i>P. stuartii</i>	38
III- Biofilms, les cités microbiennes.....	39
III-1: Les biofilms, un profit ou un défi ?.....	39
III-2: Mécanismes de développement	39
III-2.1: L'adhésion	40
III-2.2: La colonisation	40
III-2.3: La dispersion et le détachement	40
III-3: Communication au sein d'un biofilm « Quorum sensing »	41
III-3.1: Matrice extracellulaire complexe et hétérogène	41
III-3.2: Interaction entre espèces	43
III-4: Biofilms et complications médicales associées	44
III-4.1: Infections associées au matériel implanté	44
III-4.2: Infections chroniques	45
III-5: Biofilms face aux antibiotiques	45
III-6: Thérapies « Anti-Biofilms ».....	46
Méthodologies	47
I- Biochimie des protéines membranaires	48
I-1: Les détergents	48

I-2: Retrait et échange des détergents	49
I-3: Méthodes de préparation des liposomes	49
I-4: Méthodes d'incorporation des protéines membranaire au sein des protéoliposomes.....	51
I-5: Méthodes d'encapsulation de molécules solubles au sein des liposomes.....	54
II- Cristallographie aux rayons X.....	55
II-1: Bases théoriques de la cristallographie monochromatique de protéine	56
II-2: Bases pratiques de la cristallographie monochromatique de protéine	59
II-2.1 : Cristallogénèse des protéines.....	59
II-2.2: Enregistrement des données de diffraction	63
II-2.3: Traitement des données de diffraction.....	65
II-2.4: Phasage de la structure	68
II-2.5: Affinement de la structure et construction du modèle	69
II-2.6: Validation du modèle.....	71

Matériels et Méthodes

73

I- Biochimie des protéines membranaires.....	74
I-1: Transformation et expression des porines.....	74
I-2: Extraction et solubilisation des porines à partir des membranes	76
I-3: Purification des porines.....	76
I-4: Coloration nitrate d'argent	77
II-Cristallographie aux rayons X	77
II-1: Cristallogénèse.....	78
II-2: Procédures de trempage et co-cristallisation	80
II-3: Collecte et traitements des données	80
II-4: Phasage et affinement des structures	81
III- La diffusion dynamique de la lumière	82
IV- La microscopie électronique	86
IV-1 : La coloration négative.....	86
IV-2: La méthode des coupes ultrafines	87
V-La microscopie d'épifluorescence	90
V-1: Marquage des liposomes	90
V-2: Marquage des bactéries	92
VI- La microscopie à force atomique (AFM).....	92
VII- La spectroscopie de masse MALDI	93

Résultats et Discussion

96

I- Étude structure-fonction des porines: un rôle dans la résistance aux antibiotiques ...	97
I-1: Obtention des solutions protéiques pures	97
I-1.1: Expression, extraction et purification des porines	97
I-2: Obtention de cristaux de haute qualité	102
I-2.1: Optimisation de la cristallogénèse	102
I-2.2: Méthodes de co-cristallisation et de trempage.....	104
I-3: Collecte et traitements des données cristallographiques au synchrotron	105
I-3.1: Affinement des structures	109
I-4: Analyse structurale des porines de <i>P. stuartii</i>	112
I-4.1: Architecture générale des porines de <i>P. stuartii</i>	113
I-4.2: Analyse de la stabilité du trimère.....	114
I-4.3: Variabilité des boucles externes des porines	115
I-4.4: Analyse du champ électrostatique développé au sein des porines.....	118
I-4.5: Analyse fine des dimensions du canal	121
I-4.6: Analyse fine de la sélectivité ionique du canal	122
I-4.7: Distribution des charges au sein du canal	124
I-4.8: Analyse structurale du complexe porine-maltose	129
I-5: Mesures de la cinétique de translocation des antibiotiques par électrophysiologie..	130

I-5.1 : Mesures de la cinétique de translocation des antibiotiques par la méthode des gouttelettes à l'interface (DIB)	130
I-5.2 : Mesures de la cinétique de translocation des antibiotiques par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM).....	132
I-6:Étude du mécanisme de translocation du méropénème et de l'imipénème au travers la variante sauvage d'Omp-Pst1	135
I-7:Étude du mécanisme de voltage gating chez Omp-Pst2-ATCC par dynamique moléculaire	135
II- Rôle des porines de <i>Providencia stuartii</i> dans la persistance des infections bactériennes	136
II-1: Rôle des porines dans l'interaction intercellulaire	136
II-1.1: Etude des propriétés adhésives des porines <i>in vitro</i>	137
II-1.2: Rôle des porines dans la communication intercellulaire <i>in vitro</i>	153
II-1.3: Étude fonctionnelle des propriétés adhésives des porines <i>in vivo</i>	154
II-2: Caractérisation structurale du motif d'interaction inter-porines	160
Conclusion et perspectives	168
Annexes	184
Résumé	220

Tables des illustrations

Figure 1: Schéma de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif	14
Figure 2: Une représentation schématique des différentes structures bactériennes de lipopolysaccharides	15
Figure 3: Quatre modèles potentiels (A-D) illustratifs du rôle des lipopolysaccharides dans la perméabilité membranaire	16
Figure 4: La structure tridimensionnelle du complexe FhuA-fer-ferrichrome et une molécule de lipopolysaccharide associée.....	18
Figure 5: Représentation schématique des cinq cibles d'antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif.	19
Figure 6: Structures chimiques des antibiotiques β -lactames.....	20
Figure 7: Structures chimiques des antibiotiques déstructurant la membrane	21
Figure 8: Structures chimiques des antibiotiques inhibant la transcription et la réplication de l'ADN	22
Figure 9: Structures chimiques des antibiotiques inhibant la synthèse protéique	23
Figure 10: Structures chimiques des antibiotiques inhibant certaines voies métaboliques	24
Figure 11: Une représentation schématique des trois mécanismes de résistance chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif.....	26
Figure 12: Structure cristallographique d'OmpF, la porine majeure d' <i>E. coli</i>	29
Figure 13: Une représentation schématique du mécanisme de translocation de la colicine à travers OmpF.	31
Figure 14: La diminution de l'expression des porines contribue à la résistance acquise de <i>P. stuartii</i> aux antibiotiques de type β -lactames	37
Figure 15: Mesure de la cinétique de translocation d'antibiotiques à travers Omp-Pst1 par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM)	38
Figure 16: Mesure du voltage critique qui déclenche le « gating » chez Omp-Pst1 et Omp-Pst2 par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM)	39
Figure 17: Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm bactérien.....	41
Figure 18: Illustration de l'hétérogénéité spatiale d'un biofilm	42
Figure 19: Photo de microscopie électronique à balayage montrant la production de curli chez <i>E. coli</i>	43
Figure 20: Biofilms cristallins formés dans des modèles de cathéters suite à leurs incubations avec différentes espèces bactériennes	45
Figure 21: Estimation du nombre de porines insérées par liposomes.....	54
Figure 22: La diffraction aux rayons X.....	57
Figure 23: Représentation schématique de la cristallisation par diffusion de vapeur pour les protéines membranaires et solubles	61
Figure 24: Diagramme de phases.....	62
Figure 25: Représentation schématique des trois méthodes de cristallisation de protéines membranaires	63
Figure 26: Cliché de diffraction collecté sur un cristal de porine Omp-Pst1-ATCC à l'ESRF.....	65
Figure 27: Stratégie d'expression des porines de <i>P. stuartii</i> dans des souches d' <i>E. coli</i> modifiées génétiquement	98
Figure 28: Stratégie d'extraction des porines à partir de la membrane externe.....	99
Figure 29: L'optimisation du protocole de purification des porines par l'ajout d'une étape de délipidation.....	100
Figure 30: Gel SDS 15% polyacrylamide coloré au nitrate d'argent pour évaluer l'optimisation de la purification des variantes mutantes	102
Figure 31: Classification des différents cristaux de porines de <i>P. stuartii</i> obtenus en fonction de la méthode de cristallisation utilisée	104
Figure 32: Collecte de données cristallographiques sur les cristaux d'Omp-Pst1-ATCC	105
Figure 33: Représentation de Wilson des structures cristallographiques d'Omp-Pst1 résolues en absence et en présence d'un ligand.....	106
Figure 34: Empilement cristallin obtenu au sein des cristaux des différentes porines générales de <i>P. stuartii</i>	108
Figure 35: Stratégie d'affinement employée pour Omp-Pst1-99645	111
Figure 36: Architecture générale d'Omp-Pst1, la porine majoritaire chez <i>Providencia stuartii</i>	114
Figure 37: Caractérisation structurale de la stabilité du trimère au sein des porines.....	115
Figure 38: Changements conformationnels majeurs entre les porines de <i>P. stuartii</i> et leurs homologues de chez <i>E. coli</i>	116
Figure 39: Changements conformationnels majeurs au sein des variantes d'Omp-Pst1	118
Figure 40: Représentation des surfaces d'isopotentiels électrostatiques développés au sein des porines.	119
Figure 41: Caractérisation structurale de l'interaction entre LPS et porine.....	120
Figure 42: Modélisation de la dimension des canaux des porines.....	122
Figure 43: Modélisation de la sélectivité ionique au sein des canaux des porines	123

Figure 44: Distribution des résidus chargés au sein des canaux d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2	125
Figure 45: Distribution des résidus chargés au sein des canaux des porines de <i>P. stuartii</i> et leurs homologues de chez <i>E. coli</i>	126
Figure 46: Distribution des résidus chargés au sein des canaux des variantes d'Omp-Pst1	127
Figure 47: Localisation des mutations au sein des trois variantes d'Omp-Pst1 à l'entrée du canal	128
Figure 48: Caractérisation structurale du complexe Omp-Pst1 en présence du maltose	130
Figure 49: Criblage des antibiotiques par la méthode des gouttelettes à l'interface (DIB)	131
Figure 50: Mesure de la cinétique de translocation des antibiotiques par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM).....	133
Figure 51: Les structures hexamériques d'Omp-Pst2 et d'Omp-Pst1, formées par l'association en face à face de deux trimères fonctionnels	137
Figure 52: Conservation de la propriété d'auto-adhésion entre les variantes sauvages et mutantes des porines de <i>P. stuartii</i>	138
Figure 53: Chromatographie sur couche mince des solutions stocks d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2.....	140
Figure 54: Approche d'incorporation des porines dans les liposomes par dilution au dessous de la CMC du détergent	141
Figure 55: Evaluation de l'effet du LDAO sur la stabilité des liposomes	142
Figure 56: L'agrégation des protéoliposomes est favorisée par un ratio élevé des différentes porines de <i>P. stuartii</i> insérées à pH acide.....	143
Figure 57: L'agrégation des protéoliposomes est favorisée à pH acide chez les différentes porines de <i>P. stuartii</i>	144
Figure 58: Séparation des agrégats protéoliposomaux sur un gradient de sucrose.....	145
Figure 59: Fractions protéoliposomales séparées sur gradient de sucrose et suivies par gel SDS PAGE.....	146
Figure 60: L'association et l'agrégation des liposomes géants (GUV) visualisées par microscopie d'épifluorescence suite à l'insertion des porines	148
Figure 61: L'agrégation des liposomes unilamellaires (LUV) est visualisée par microscopie électronique suite à l'insertion des porines.....	149
Figure 62: L'insertion d'Omp-Pst2, à des concentrations élevées, génère la formation de films protéolipidiques cristallins caractérisés par TEM	150
Figure 63: Modèle de l'interaction hexamérique face à face d'Omp-Pst2 insérée dans une bicouche membranaire	151
Figure 64: L'image topographique des films protéolipidiques cristallins prise par microscopie à force atomique (AFM).....	152
Figure 65: Transfert de la fluorescéine entre deux populations de liposomes géants <i>via</i> Omp-Pst1 et Omp-Pst2	153
Figure 66: Identification de l'identité protéique "in gel" par spectroscopie de masse	155
Figure 67: Images obtenues par microscopie électronique en coloration négative sur des bactéries d' <i>E. coli</i> exprimant Omp-Pst2, au sein d'un biofilm interstitiel (2D).....	157
Figure 68: Images obtenues par microscopie d'épifluorescence sur des bactéries B1, B2 et <i>P. stuartii</i> au sein d'un biofilm 3D	158
Figure 69: Images obtenues par microscopie électronique après coupes ultrafines sur des bactéries d' <i>E. coli</i> exprimant les porines d'intérêt et la souche de <i>P. stuartii</i> au sein d'un biofilm mature	159
Figure 70: Les structures hexamériques d'Omp-Pst2 et Omp-Pst1 formées par l'association en face à face de deux trimères fonctionnels	161
Figure 71: Les boucles externes des porines présentent une propension élevée à former des interactions de type « steric zipper »	162
Figure 72: Caractérisation structurale des motifs de dimérisation d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2	164
Figure 73: Conservation des séquences prônes à former des interactions de type <i>steric zipper</i> au sein des bactéries des genres <i>Providencia</i> et <i>Proteus</i>	166

Listes des tableaux

Tableau 1: La mesure de la concentration minimale inhibitrice (MIC) est illustrée pour deux espèces bactériennes (<i>P. stuartii</i> et <i>E. coli</i>), en réponse à différents antibiotiques de type β -lactames.	36
Tableau 2: Les porines sont des contributeurs majeurs dans la résistance aux antibiotiques de type β -lactames.	37
Tableau 3: Composition du milieu urée synthétique	95
Tableau 4: Résumé des paramètres cristallographiques et des statistiques d'intégration des données pour les différentes structures de porines résolues.....	109
Tableau 5: Résumé des paramètres cristallographiques et des statistiques d'affinement pour les différentes structures de porines résolues.	112
Tableau 6: Résumé des paramètres cristallographiques et des statistiques d'affinement pour les deux structures peptidiques résolues.....	163

Abréviations

ADP: Atomic displacement parameters
AFM: Atomic force microscopy
BLM: Black lipid membrane
BSA: Bovine sérum albumine
C8E4: Tetraethyleneglycol mono-octylether
CDC: Centers for disease control and prevention
CHAPSO: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate
CMC: Concentration micellaire critique
CNS: Crystallography and NMR system
NCS: Non-crystallographic symmetry
DIB: Droplet interface bilayer
DMPC: Dimyristoylphosphatidylcholine
Dansyl PE: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl)
DPhPC: 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine
ESBL: Extended spectrum beta-lactamase
ESRF: European synchrotron radiation facility
GUV: Giant unilamellar vesicle
HTX: High throughput crystallography
HPTEM: High pressure thin electron microscopy
IPTG: Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
MDR: Multidrug resistance
MIC: Minimum inhibitory concentration
LB: Luria-Bertani
LDAO: N-dodecyl-N, N-dimethylamine-N-oxide
Liss Rhod PE: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)
LPS: Lipopolysaccharides
LUV: Large unilamellar vesicle
OMRS : Origin repair mutagenesis system
OmpPst: Outer membrane protein *Providencia stuartii*
OPOE: Octyl polyoxyethylene
PBP: Penicillin binding protein
PEG: Polyethylene glycol
PHENIX: Python-based hierarchical environment for integrated crystallography
POPC: Palmitoyl-oleyl phosphatidyl choline
SDS: Sodium dodecylsulfate
SEM: Scanning electron microscopy
SM: Spectroscopie de masse
SUV: Small unilamellar vesicle
TAE: Tris base, acetic acid, EDTA
TEM: Transmission electron microscopy
TLS: Translation libration screw
TLSMD: Translation libration screw motion determination
XDS: X-ray detector software

Introduction

I- Introduction générale

Depuis la découverte de la pénicilline, des millions de vies ont été sauvées grâce aux antibiotiques. Leur utilisation abusive a cependant amené les micro-organismes à développer des mécanismes de résistance ¹. Pour résister aux antibiotiques, les bactéries peuvent exploiter trois stratégies principales : la production d'une enzyme modifiant ou détruisant l'antibiotique, une modification de la cible de l'antibiotique, ou encore l'imperméabilisation de la membrane de la bactérie ¹. Ce dernier mécanisme, qui vise à réduire l'accumulation de drogues au sein de la bactérie est parmi les plus préoccupants. Il repose principalement sur une augmentation de l'efflux grâce à des pompes membranaires permettant à la bactérie d'expulser les molécules toxiques des compartiments cytoplasmiques et périplasmiques vers le milieu externe ². Mais pour que cette stratégie de résistance soit viable chez les bactéries à Gram-négatif, il faudra également réduire l'influx des antibiotiques au travers de la membrane externe. Chez les bactéries à Gram-négatif, les protéines en charge de l'influx sont les porines. Ainsi, parmi les mécanismes visant la réduction de l'influx, on trouvera notamment des mutations au sein des porines, et/ou l'altération de leur expression. De telles observations ont été rapportées dans de nombreux isolats cliniques multi-résistants au cours de la dernière décennie ³. Bien que la structure moléculaire de cette famille de protéine soit connue et bien étudiée chez *E. coli*, de nombreuses questions restent sans réponse. En particulier, la manière dont les bactéries adaptent leurs porines d'un point de vue structural suite à un traitement aux antibiotiques, n'est pas encore connue.

L'objectif premier de notre étude a donc été d'identifier les déterminants moléculaires responsables de la diminution de l'influx au travers des porines. Face à l'émergence des infections nosocomiales multi-résistantes, une compréhension structurale de ce qui rend les porines plus ou moins perméables aux antibiotiques est nécessaire afin de permettre le design rationnel de nouvelles drogues capables de contrecarrer ces systèmes.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous aborderons le problème de la résistance des bactéries aux antibiotiques et expliciterons le rôle joué par les porines dans ce phénomène. Dans ce contexte, nous justifierons le choix de *Providencia stuartii* comme modèle d'étude. Nous introduirons aussi le concept de « biofilm bactérien », et détaillerons en quoi ils sont souvent associés à des complications médicales graves. Nous ferons alors un point sur les

thérapies anti-biofilm existantes à ce jour.

Dans la deuxième partie du manuscrit, nous décrirons les méthodologies utilisées au cours de cette thèse, en insistant sur la biochimie des protéines membranaires et la cristallographie aux rayons X en particulier. Nous présenterons enfin nos résultats et les discuterons. Nous finirons par une courte conclusion et l'énonciation de quelques unes des nombreuses perspectives de nos travaux.

II- L'alarmante résistance des bactéries aux antibiotiques

II-1: L'histoire des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances dont le rôle est de détruire les microorganismes, parmi lesquels figurent les bactéries. On distingue les antibiotiques à effet bactéricide, qui détruisent les bactéries, et ceux à effet bactériostatique, qui empêchent leur multiplication. Pasteur et Joubert furent les premiers à observer un effet bactériostatique, en 1877. A l'époque, ils s'intéressaient aux réactions produites par l'injection du bacille du charbon, « *Bacillus anthracis* », sur des animaux. En 1897, ce fut E. Duchesne qui le premier observa l'effet bactéricide de la moisissure « *Penicillium glaucum* » sur *Escherichia coli*. Mais il fallut attendre trente ans pour que Fleming décrive explicitement qu'une substance secrétée par « *Penicillium notatum* », et qu'il nomma pénicilline, était responsable de ce phénomène. Flemming essaya d'isoler la pénicilline pendant de nombreuses années mais ce furent Florey et Chaindeux qui y parvinrent en 1939. Fleming, Flory et Chaindeux obtinrent le prix Nobel de médecine en 1945, pour la découverte de ce qui devait être le premier antibiotique. Sa production et sa prescription commencèrent dès 1942, et en 1945, quasiment toutes les pharmacies américaines en proposaient dans leurs rayons. Entre les années 50 et 70, une multitude de molécules dérivées de la pénicilline fut mise sur le marché, et leur utilisation abusive démarra. Dès cet instant, des souches bactériennes présentant une multi-résistance aux antibiotiques apparurent. C'est ce qui explique qu'aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique soit plus frileuse quant au développement de nouveaux antibiotiques. Ceux-ci doivent en effet répondre à un cahier des charges plus complexe lequel inclut de ne pas induire de résistance trop rapidement, d'avoir un minimum d'effets secondaires et d'être administrables par voie orale.

II-2: L'enveloppe des bactéries, une barrière sélective aux antibiotiques

Les bactéries sont isolées du milieu extérieur grâce à leur paroi. Selon le type de bactérie considéré, la composition de cette paroi varie. Chez les bactéries à Gram-positif, la paroi est principalement constituée de peptidoglycane, une structure poreuse qui laisse passer de nombreuses substances. Les bactéries à Gram-négatif possèdent, quant à elles, une double bicouche lipidique, c'est à dire une membrane externe et une membrane cytoplasmique délimitant un espace périplasmique (20 à 80 nm d'épaisseur) (Figure 1). La membrane externe est asymétrique dans la mesure où les lipides présents dans son feuillet externe sont des lipopolysaccharides (LPS). Cette membrane contient par ailleurs de nombreuses protéines intrinsèques, toutes repliées en tonneau β . Parmi celles-ci, on trouve des protéines « canal », à diffusion non spécifique : ce sont les porines ⁴.

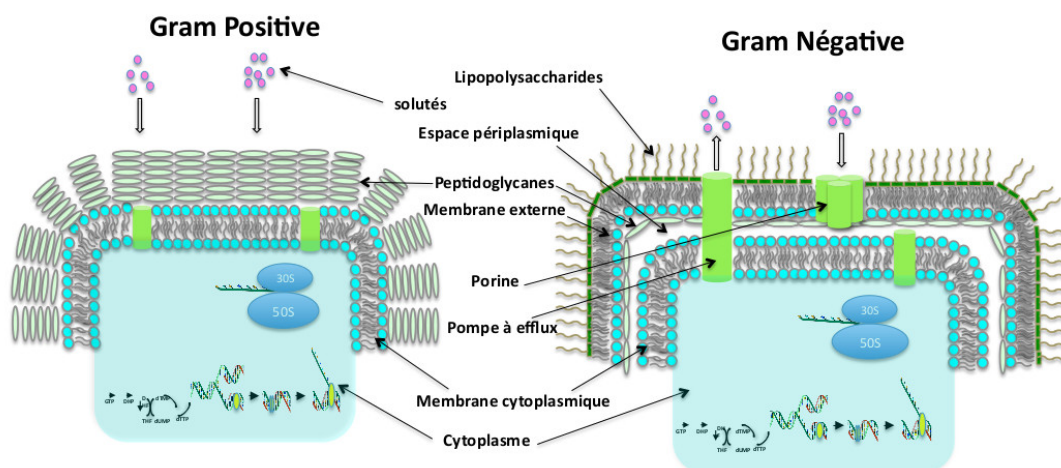


Figure 1: Schéma de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. La paroi des bactéries à Gram-positif possède une seule bicouche membranaire, tapissée d'un revêtement externe de peptidoglycane (90%). Quant aux bactéries à Gram-négatif, elles possèdent une double bicouche lipidique. La membrane interne est composée d'une bicouche symétrique de phospholipides, contrairement à la membrane externe qui est composée d'une bicouche asymétrique, dont les constituants principaux sont les lipopolysaccharides et les phospholipides. Ces deux membranes sont séparées par un périplasma dans lequel se trouve un réseau de peptidoglycane. De nombreuses protéines sont insérées dans ces membranes, telles que les porines (membrane externe) et les transporteurs (membrane interne).

Les porines générales sont en charge de l'assimilation des nutriments et autres molécules hydrophiles, par simple diffusion selon un gradient de concentration. Cependant, certaines substances amphiphiles peuvent transiter directement à travers la membrane externe, sans emprunter la voie des porines. Dans ce cas, ces molécules devront se confronter aux LPS présents dans le feuillet externe de la membrane externe, lesquels pourront, par leur nature, ralentir la diffusion.

II-2.1: La membrane des bactéries à Gram-négatif, une barrière lipidique

Nous avons déjà mentionné que la membrane externe des bactéries à Gram-négatif présente une composition asymétrique, avec des LPS exposés sur son versant externe. Les LPS présentent une structure amphiphile avec une partie polysidique chargée et hydrophile, et une partie aliphatique hydrophobe. La partie aliphatique nommée lipide A est cytotoxique et correspond aux endotoxines libérées massivement lors de la lyse bactérienne. La partie polysidique porte les spécificités antigéniques ^{5,6} (Figure 2).

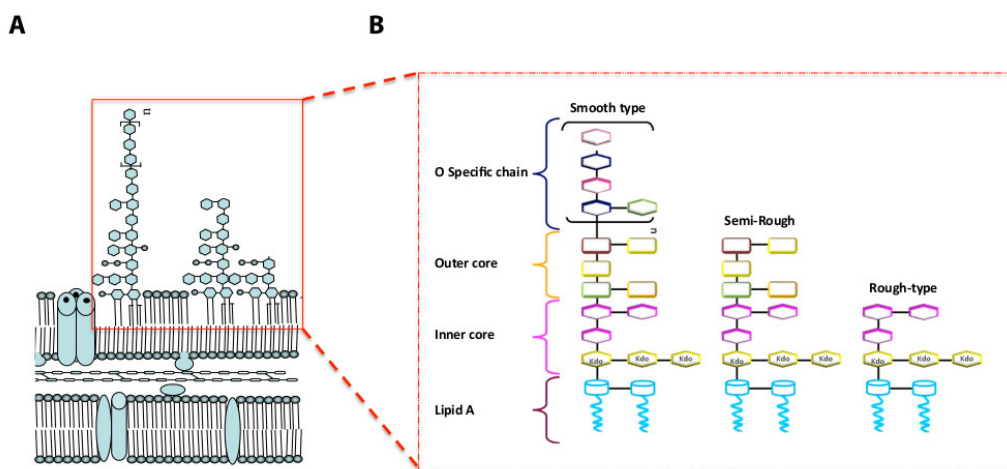


Figure 2: Une représentation schématique des différentes structures bactériennes de lipopolysaccharides. Trois structures différentes de LPS sont identifiées chez les bactéries à Gram-négatif : la structure complète de très longues chaînes latérales et lisses « smooth type », la structure d'une longueur moyenne « semi-rough » et la structure rudimentaire « rough-type ». Cette variabilité dépend des espèces bactériennes.

Le lipide A permet l'ancrage des LPS dans la bicouche lipidique et sa structure est fortement conservée parmi les bactéries à Gram-négatif. Elle est constituée de deux sucres aminés liés à des acides gras. La portion la plus distale des LPS, *i.e.* celle qui constitue l'interface entre la bactérie et le milieu extracellulaire, est beaucoup moins conservée. Elle se compose de chainons répétitifs comprenant 3 à 8 unités hexaosidiques (glucose, galactose, mannose, etc.) ou plus complexes (paratose, tyvelose, etc.), et se nomme « chaîne O spécifique ». La région oligosaccharide cœur, qui connecte le lipide A à la portion la plus distale, est constituée d'un noyau interne lié au premier par l'intermédiaire d'un sucre acide (l'acide 3-desoxy-D-manno-2-octulosonique ou KDO) et d'un noyau externe lié à la seconde. La structure du noyau interne est très conservée chez les bactéries à Gram-négatif ⁷. La structure du noyau externe

n'est pas conservée mais constituée d'un nombre variable d'unités hexose ou hexosamine.

La structure des LPS varie en fonction de l'espèce et de la souche bactérienne. Selon que les chaînes osidiques sont longues ou courtes, on distingue trois types de LPS : les « smooth type » (au-delà de 100 kDa), les « rough-type » (moins de 50 kDa) et les « semi-rough » (entre 50 et 100 kDa) (Figure 2 B). C'est la différence de structure et de composition de ces chaînes qui confère aux LPS leurs propriétés antigéniques ⁶.

De par leur nature, les LPS constituent une barrière plus ou moins efficace contre la pénétration des antibiotiques hydrophobes. Les ions divalents jouent également un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane externe. En s'intercalant entre deux molécules de LPS, ils établissent une barrière scellée qui limitera plus fortement le passage des molécules hydrophobes à travers la membrane. Les travaux de Varra et *al* ⁷ montrent que l'ajout d'agents chélateurs (EDTA) induit la déstabilisation de cette barrière, entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire (Figure 3).

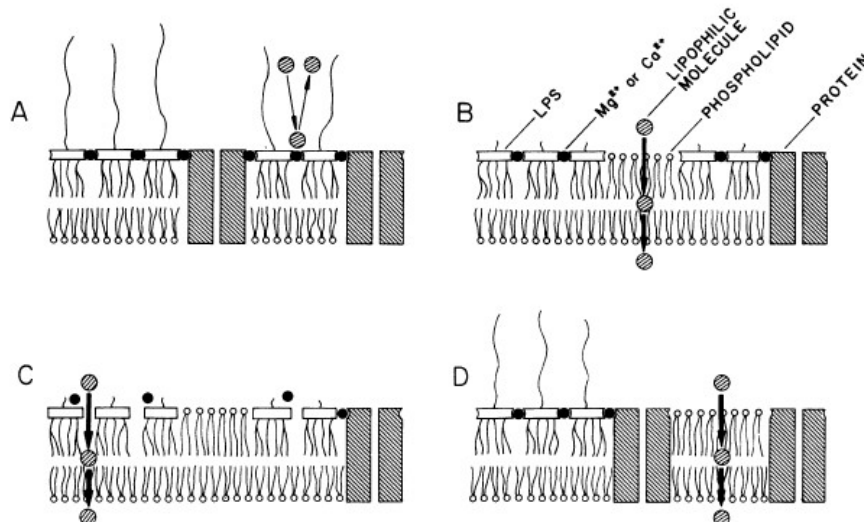


Figure 3: Quatre modèles potentiels (A-D) illustratifs du rôle des lipopolysaccharides dans la perméabilité membranaire ⁸. La structure des LPS, leur répartition dans le feuillet externe des bactéries à Gram-négatif, ainsi que la présence ou l'absence des ions divalents dans le milieu, sont autant d'éléments qui contribuent à la perméabilité des molécules lipophiles à travers la membrane externe des bactéries à Gram-négatif.

II-2.2: La membrane des bactéries à Gram-négatif, une barrière protéique

Présentes dans la membrane externe, les porines sont des protéines transmembranaires qui forment des canaux protéiques permettant la diffusion des nutriments et des molécules hydrophiles dans le périplasme. Elles peuvent, d'une façon générale, laisser transiter toutes les molécules de poids moléculaire inférieur à 600 Da ⁴. Elles servent donc

également de porte d'entrée pour les antibiotiques hydrophiles, parmi lesquels les β -lactames, les tétracyclines et les fluoroquinolones. Les porines sont généralement organisées en trimères. Il existe cependant des porines qui sont monomériques, par exemple OmpG chez *E. coli* ou MOMp chez *Campilobacter jejuni*. Selon leur spécificité, encodée dans leur structure, on distinguera deux classes de porines : les porines générales ou « non spécifiques » et les porines « spécifiques »^{9,10} :

Les porines générales, non spécifiques, telles qu'OmpF, OmpC et PhoE chez *E. coli*, sont uniquement impliquées dans la diffusion passive. Leur spécificité stérique est similaire d'une porine à l'autre. Cependant, la distribution de résidus chargés le long de leur canal leur confère une spécificité ionique variable. Par exemple, les porines anion-sélectives, comme PhoE, favorisent le passage des solutés chargés négativement quand les porines cations-sélectives comme OmpF et OmpC favorisent le passage de molécules chargées positivement.

Les porines spécifiques telles que LamB et ScrY sont impliquées dans la diffusion sélective du maltose et du sucrose, respectivement. Ces porines sont spécifiquement exprimées dans des conditions de carence en l'un ou l'autre de ces composés. Elles permettront ainsi de palier à l'assimilation réduite à travers les porines non spécifiques, laquelle chute drastiquement quand les gradients de concentration sont défavorables⁷.

II-2.3: Interactions entre LPS et porines, exemple LPS-FhuA

Les LPS de la membrane externe sont en perpétuelle interaction avec les protéines exprimées au sein de cette membrane. Un exemple illustratif est celui de FhuA, un récepteur du ferrochrome exprimé dans la membrane externe d'*E. coli*. La résolution de la structure cristallographique du complexe FhuA avec un LPS a permis de révéler la base moléculaire de leur interaction¹¹. Celle-ci est de type électrostatique et résulte du rapprochement des groupements basiques de la surface extracellulaire de FhuA avec des groupements acides des LPS. Par exemple, le groupement 4'-phosphate du lipide A interagit très fortement avec le groupement amine de la lysine 351 (distance ~ 2.5 Å). De la même façon, le groupe carboxylate de KDO_{II} interagit avec le groupement guanidine de l'Arg384 (distance ~ 3 Å) (Figure 4).

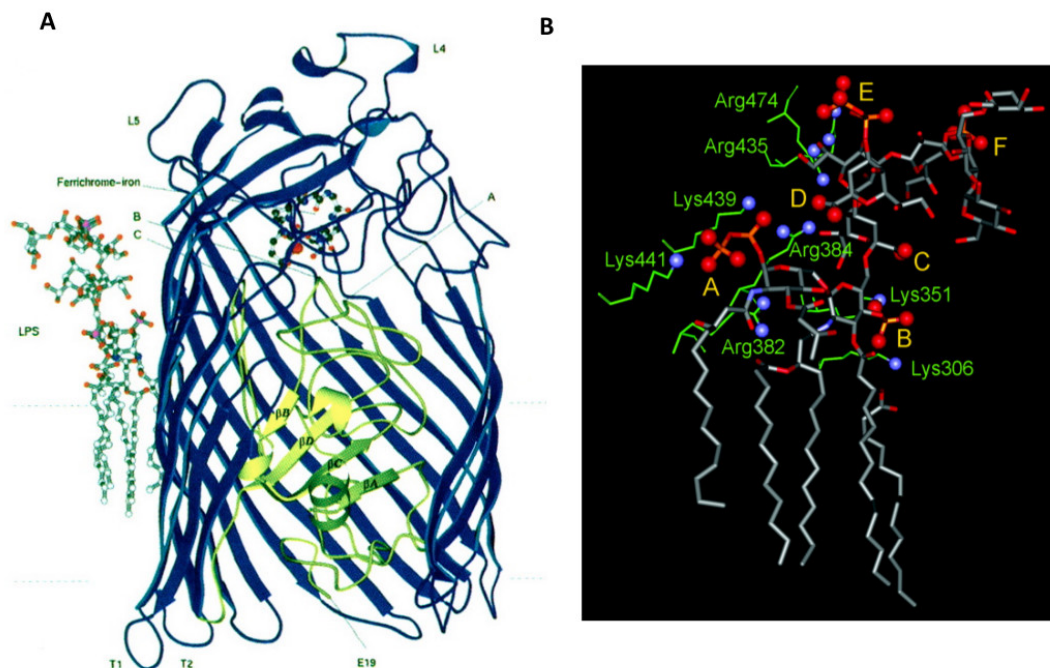


Figure 4: La structure tridimensionnelle du complexe FhuA-fer-ferrichrome et une molécule de lipopolysaccharide associée. A/ La structure de FhuA est représentée en tonneau beta coloré en bleu. Les résidus 621 à 723 ont été retirés pour permettre une vue dégagée du bouchon coloré en jaune. La molécule de LPS est représentée comme un modèle de bâtons où la chaîne principale est colorée en vert, les atomes d'oxygène en rouge et les molécules de carbone en blanc (Figure adaptée de ¹¹). B/ Représentation des résidus impliqués dans l'interaction entre FhuA et la molécule de LPS. L'interaction est de nature électrostatique, elle implique d'une part des résidus chargés négativement appartenant à la molécule de LPS, tels que la 1-pyrophosphate de GlcN_I ou glucosamine réducteur (A), la 4'-phosphate de GlcN_{II} ou glucosamine non réducteur (B), la KDO_I carboxylate (C), la KDO_{II} carboxylate (D), la Hep_I 4-pyrophosphate (E) ou la Hep_{II} 4-phosphate (F), et d'autre part des résidus chargés positivement appartenant au tonneau beta de FhuA (code PDB : 1QFG), tels que les lysines 306, 351, 441 et 439, et les arginine 382, 384, 435 et 474 ¹².

II-3: Les différentes classes d'antibiotiques

La majorité des antibiotiques est obtenue par héli-synthèse à partir d'une structure de base commune d'origine naturelle. Ils appartiendront pourtant à six familles chimiques très différentes. Les cyclines, les macrolides, les aminosides, l'oxazolidinone, les β -lactames ou les phénicolés. Une septième famille d'antibiotique est distinguée des autres du fait de son origine totalement synthétique, les quinolones. Le nombre élevé d'antibiotiques disponibles impose de les classer, ce qui peut être fait selon différents critères. Un premier peut être l'impact économique de l'antibiotique sur le marché de l'industrie pharmaceutique. Les antibiotiques comptent pour 24 milliards de dollars de chiffre d'affaire par an, dont 30% incombent aux céphalosporines de la famille des β lactames ¹³. Un deuxième critère plus scientifique est celui de la cible visée par un antibiotique ; c'est celui que nous utiliserons dans la partie suivante ¹⁴.

II-4: Cibles des antibiotiques

La connaissance du mode d'action des antibiotiques est préliminaire à toute compréhension des mécanismes de résistance. On distingue cinq modes d'action majeurs (Figure 5) : l'inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane, la désorganisation de la membrane, l'inhibition de la transcription ou de la réplication de l'ADN, l'inhibition de la synthèse protéique et enfin l'inhibition de certaines voies métaboliques.

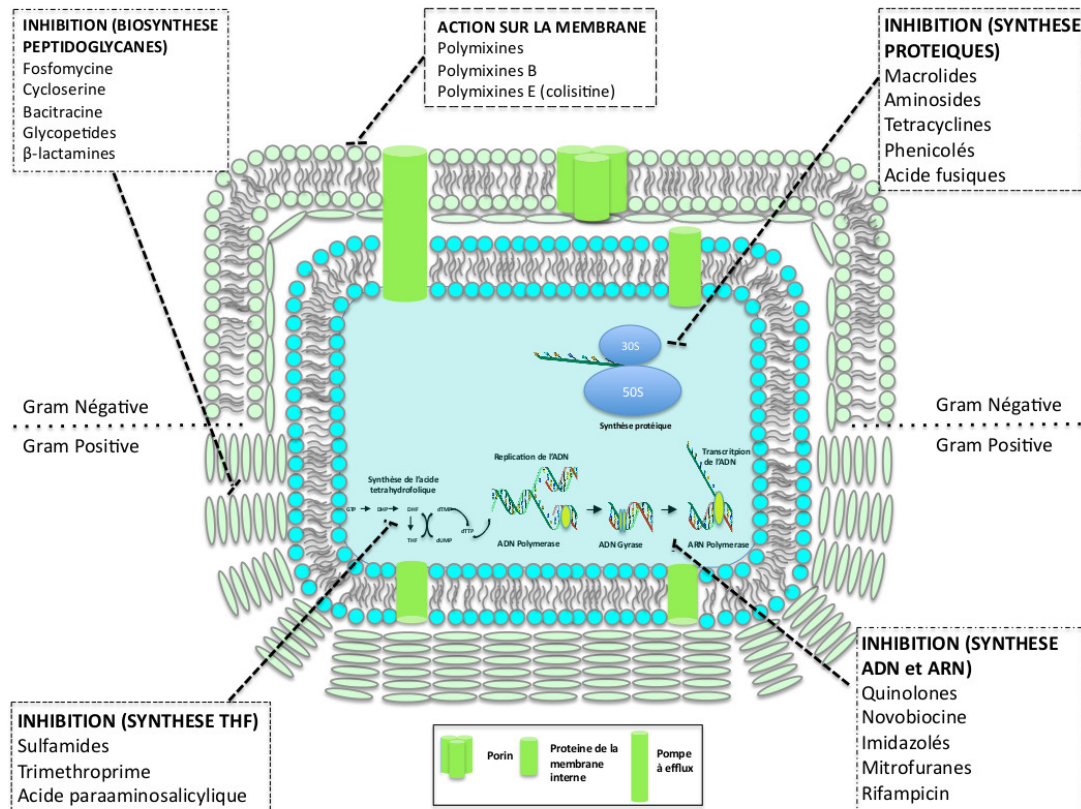


Figure 5: Représentation schématique des cinq cibles d'antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif.

Action sur la biosynthèse du peptidoglycane

La paroi d'une bactérie est sa première ligne de défense contre les envahisseurs externes. Plusieurs classes d'antibiotiques auront donc pour cible des enzymes intervenant dans la synthèse de cette paroi, qui doit sa rigidité à un réseau réticulé de peptidoglycanes. La rigidité de cette dernière résulte d'un réseau de peptidoglycanes réticulés. Les antibiotiques de type β -lactames (Figure 6) inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane par compétition avec le dipeptide D-alanyl-D-alanine qui entre dans la composition de celui-ci. Leurs cibles sont les protéines de liaison de la pénicilline ou PBP dont l'inhibition entraîne la lyse de la bactérie. La pénétration des β -lactames à travers la paroi bactérienne sera donc

déterminante pour leur efficacité. Cette diffusion sera plus aisée à travers la paroi des bactéries à Gram-positif qu'à travers celle des bactéries à Gram-négatif. Chez ces dernières, en effet les β -lactames devront diffuser au travers des porines pour accéder à leur cible. Leur efficacité dépendra donc de leur cinétique de translocation au travers de ces dernières, laquelle découle de leur nature et structure chimique.

Parmi les β -lactames, les carbapénèmes font figures de molécules idéales car ils présentent à la fois un spectre antibactérien très large et une résistance à la digestion enzymatique par les beta-lactamases. Ils représentent aussi à la fois la dernière ligne de défense dans le traitement d'infections bactériennes et le premier choix du praticien dans le cas d'infections contractées à l'hôpital (nosocomiales). Plusieurs molécules de cette famille sont commercialisées, parmi lesquelles l'imipénème, l'ertapénème et le doripénème.

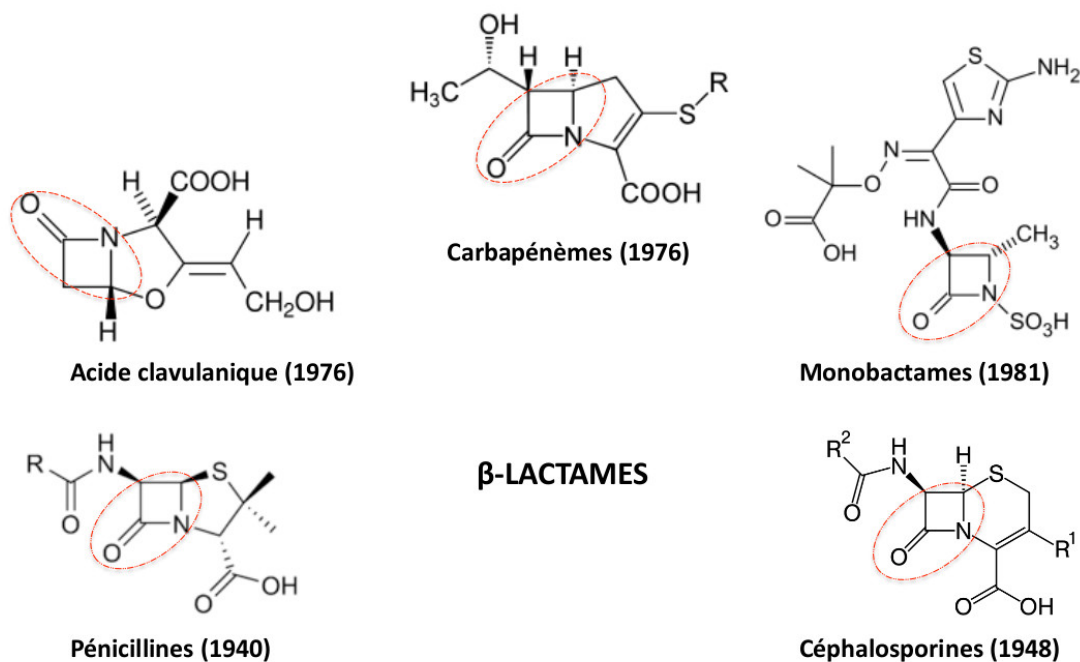


Figure 6: Structures chimiques des antibiotiques β -lactames. Cette classe d'antibiotiques est caractérisée par un noyau β -lactame (pointillés en rouge). En dehors des monobactames, l'anneau β -lactame est couplé à un autre cycle propre à chaque classe d'antibiotiques, telles que les pénicillines, les céphalosporines ou les carbapénèmes. Les carbapénèmes se distinguent des pénicillines par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2-C3. Au sein d'une même classe d'antibiotiques, les chaînes latérales (R , R^1 et R^2) permettent de distinguer les différentes molécules. Il peut exister des chaînes latérales similaires entre différentes classes d'antibiotiques. Les cinq structures illustrées ci-dessus ont comme cible la PBP, à l'exception de l'acide clavulanique. Ce dernier est un inhibiteur de la β -lactamase et il est administré conjointement avec certaines pénicillines afin d'en élargir le spectre.

Action sur la stabilité membranaire

Les polymyxines présentent une structure amphiphile, grâce à laquelle ils vont

pouvoir agir comme des détergents. L'insertion de leur portion hydrophobe dans la membrane conduira en effet à la désorganisation de la structure membranaire, provoquant ainsi la lyse cellulaire. Les polymyxines sont actives envers de nombreuses bactéries à Gram-négatif, et notamment les *entérobactéries*. Étant donné leur faible absorption et leur forte toxicité neuronale et rénale, ils ne sont cependant que très rarement prescrits. De nos jours, seules les polymyxines B et E sont utilisées (Figure 7). On les réserve généralement au traitement d'infections bactériennes chroniques, notamment à *Pseudomonas aeruginosa* dans le contexte de la mucoviscidose.

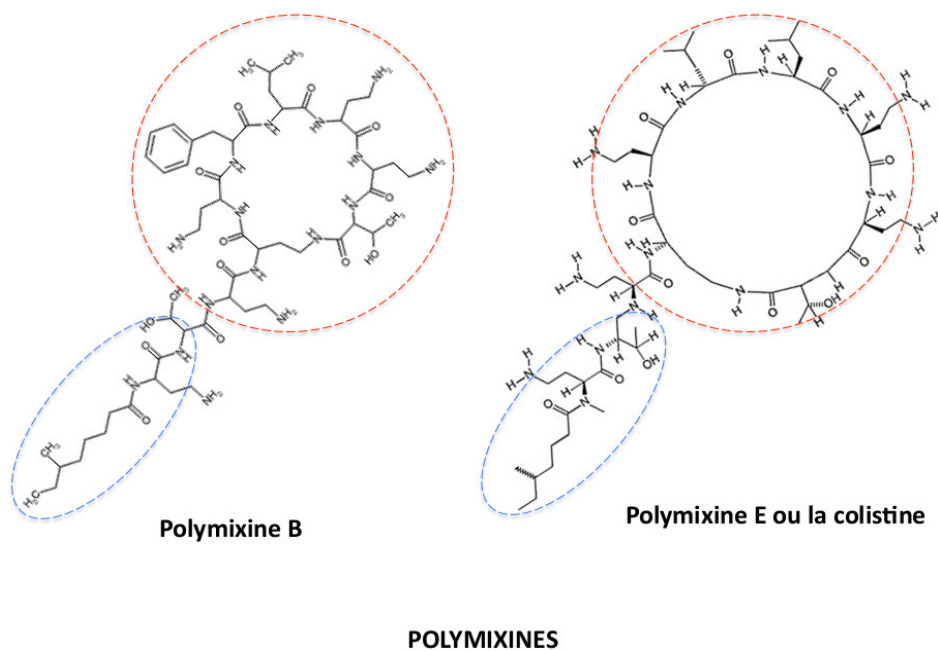
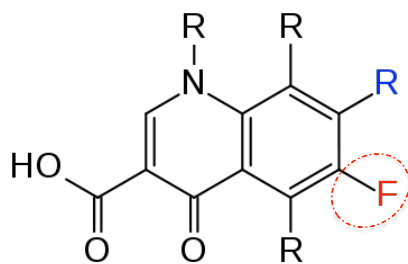


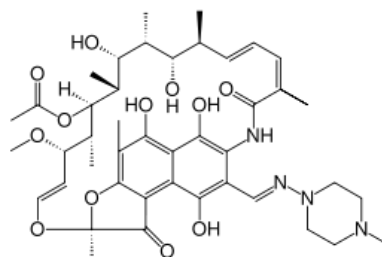
Figure 7: Structures chimiques des antibiotiques déstructurant la membrane. La structure des polymyxines, des antibiotiques peptidiques cycliques, montre le caractère amphiphatique composé d'une tête hydrophile (pointillés rouges) et d'une queue hydrophobe (pointillés bleus).

Action sur l'ADN

Les rifampicines et les quinolones ciblent la transcription et la réplication de l'ADN, respectivement. La cible des quinolones est l'ADN gyrase, à laquelle elles accèdent par diffusion au travers des porines puis à travers la membrane plasmique. En se liant à cette protéine, les quinolones l'empêchent de fixer l'ADN, ce qui conduira à une inhibition de sa ligation et à son relargage sous la forme de fragments dans le cytoplasme. La rifampicine, quant à elle, pénètre au sein des bactéries en traversant directement ses bicouches lipidiques. Elle se fixe ensuite sur la sous-unité β de l'ARN polymérase empêchant ainsi l'initiation de la synthèse des ARNm (Figure 8).



Fluoroquinolones



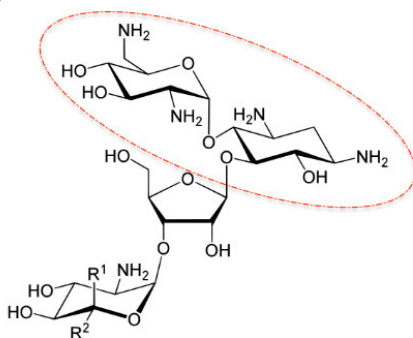
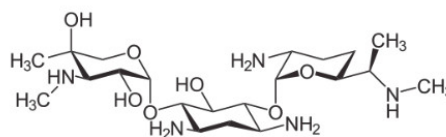
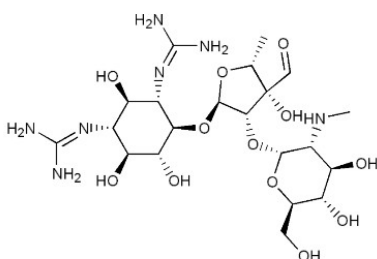
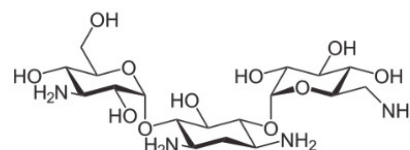
Rifampicine

Figure 8: Structures chimiques des antibiotiques inhibant la transcription et la réplication de l'ADN. La structure des fluoroquinolones est représentée à gauche, où la structure de base des quinolones a été modifiée chimiquement par l'ajout d'un groupement fluor (pointillés rouges). Ceci permet d'augmenter fortement la pénétration de ces molécules au sein des cellules (200 fois plus)¹⁵. La structure de la rifampicine est également représentée, à droite.

Inhibition de la synthèse protéique

La traduction des ARNm en protéines s'effectue au niveau du ribosome composé de deux sous-unités, 30S et 50S. Les aminoglycosides et les macrolides inhibent la synthèse des protéines en agissant sur l'une ou l'autre de ces deux sous-unités, respectivement (Figure 9). Les aminoglycosides empruntent la voie des porines pour pénétrer au sein des bactéries à Gram-négatif et se fixer à la sous-unité 30S de leurs ribosomes, provoquant des erreurs de reconnaissance des codons et des anticodons. Ceci entraîne l'incorporation d'acides aminés non programmés dans la chaîne peptidique en formation, conduisant à la désorganisation cellulaire et donc à la mort de la bactérie. Les macrolides, quant à eux, pénètrent au sein de la bactérie à travers la barrière lipidique pour se fixer sur la sous-unité 50S du ribosome, dans le voisinage du site P. Ils empêcheront ainsi l'élongation du peptide au cours de la synthèse.

A/

**Néomycine B** (R1:CH₂NH₂ ; R2: H)**Néomycine C** (R1:H ; R2: CH₂NH₂)**Gentamycine****AMINOGLYCOSIDES****Streptomycine****Kanamycine**

B/

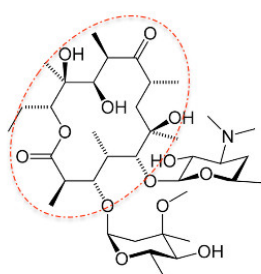
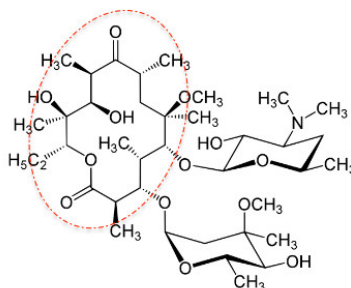
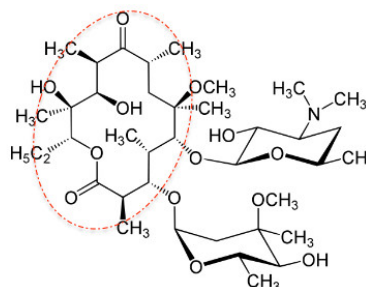
**Érythromycine****Clarithomycine****Azithromycine**

Figure 9: Structures chimiques des antibiotiques inhibant la synthèse protéique. A/ La structure des aminoglycosides est composée de deux à cinq unités de sucre (glucides) substitués par des fonctions amines (-NH₂). Elle regroupe les familles de streptomycine, gentamycine, kanamycine et de la néomycine B ou C. Cette dernière famille est obtenue par modifications chimiques de la structure de base, la néamine (en pointillés rouges). Ces modifications ont pour but d'améliorer ses propriétés thérapeutiques, notamment la pénétration au sein de la cellule, l'affinité à la cible, etc. B/ La structure des macrolides est également représentée comme un macrocycle de lactone (pointillés rouges) souvent associée à des sucres, telles que l'érythromycine, la clarithomycine et l'azithromycine.

Inhibition de certaines voies métaboliques

L'acide tétrahydrofolique (THF) intervient dans la synthèse des purines et des pyrimidines qui servent de précurseurs dans la synthèse de l'ADN. Le THF est synthétisé à

partir de l'acide para-amino-benzoïque (PABA) sous l'action d'une enzyme, la dihydroptéroate synthétase (DPS). Les sulfamides, grâce à leur analogie structurale au PABA, inhibent la DPS, conduisant à la modération de la croissance cellulaire (Figure 10).

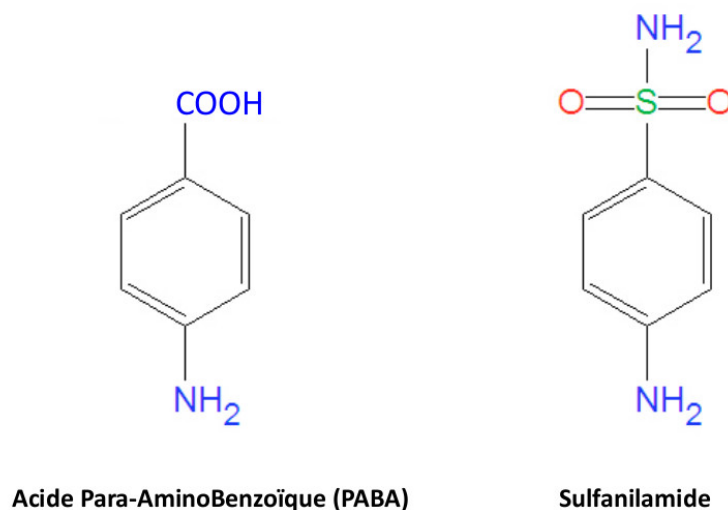


Figure 10: Structures chimiques des antibiotiques inhibant certaines voies métaboliques. Le sulfanilamide est un dérivé d'antibiotiques appartenant à la famille des sulfamides. C'est un analogue structural de l'acide para-amino-benzoïque (PABA).

II-5: La résistance aux antibiotiques

L'utilisation massive d'antibiotiques en agriculture ainsi dans les domaines de la santé humaine et animale a favorisé l'émergence de mécanismes de résistance. Or, la vitesse d'adaptation des microorganismes dépasse largement notre capacité à développer de nouvelles drogues. Le risque de contracter une infection antibio-résistante devient donc mécaniquement de plus en plus important. Parmi ces mécanismes de défense, certains sont naturels et rappellent que la première source de production d'antibiotiques est le mode bactérien. Les gènes codant pour ces résistances naturelles pourront passer de bactérie à bactérie par transfert horizontal. D'autres mécanismes peuvent être induits par des mutations spontanées. Des bactéries possédant plusieurs gènes de résistance à divers antibiotiques sont dites multi résistantes. Ces phénotypes se disséminent de plus en plus rapidement et sont donc observés de plus en plus fréquemment.

II-6: L'émergence des bactéries multi-résistantes

Par définition, les bactéries multi-résistantes sont des bactéries qui cumulent plusieurs phénotypes de résistance, leur permettant ainsi de résister à plusieurs familles d'antibiotiques. Cela suppose évidemment l'emploi de différents mécanismes de résistances¹⁶. On distingue quatre type de multi-résistance aux antibiotiques:

Phénotype de résistance croisée

Ce terme désigne des bactéries qui présentent une résistance à plusieurs antibiotiques appartenant à la même famille. Cette résistance est due à un seul mécanisme, et résulte d'une sélection croisée. Un exemple typique est celui des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi, qui sont capables d'hydrolyser un grand nombre de β -lactames. On peut également citer les mutations dans les topoisomérases de type II, gyrases et topo-isomérases de type IV, qui confèrent une résistance à de multiples fluoroquinolones¹⁷.

Phénotype de résistance croisée étendu

Ce terme désigne des bactéries qui présentent une résistance à des antibiotiques appartenant à différentes familles, mais en n'exploitant qu'un mécanisme de résistance. L'exemple le plus caractéristique est l'expression des pompes à efflux, qui permettent l'extrusion d'une large gamme de substrats¹⁸.

Phénotype de co-résistance

Ce terme désigne des bactéries qui présentent une résistance à des antibiotiques appartenant à différentes familles et qui exploitent à dessein plusieurs mécanismes de résistance¹⁹.

Phénotype de résistance additive ou coopérative

Ce terme désigne des bactéries qui présentent une résistance à des antibiotiques appartenant à la même famille en utilisant des mécanismes différents. L'exemple typique est celui de la résistance de *Staphylococcus aureus* aux tétracyclines, lesquelles sont inactivées soit par extrusion par une pompe à efflux, soit par protection de leur cible²⁰. Un autre exemple est celui de la résistance à l'érythromycine chez *E. coli*, qui implique deux types de gènes: le premier code pour une protéine pouvant hydrolyser l'antibiotique alors que le deuxième code pour une version modifiée (et insensible) de la cible. La combinaison des deux mécanismes est connue pour conférer ainsi de très hauts niveaux de résistance à

l'érythromycine ²¹.

II-7: Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

Les bactéries exploitent plusieurs voies génétiques pour acquérir un phénotype de résistance, parmi lesquelles les mutations, l'acquisition de gènes par simple échange allélique et l'acquisition de plasmides ou autres éléments transposables. Ces modifications génétiques permettront ainsi la mise en place de l'une ou de plusieurs des trois stratégies de résistances suivantes (Figure 11) : la synthèse d'enzymes dégradant ou inactivant les antibiotiques, la modification de la cible des antibiotiques et la modification de la perméabilité membranaire.

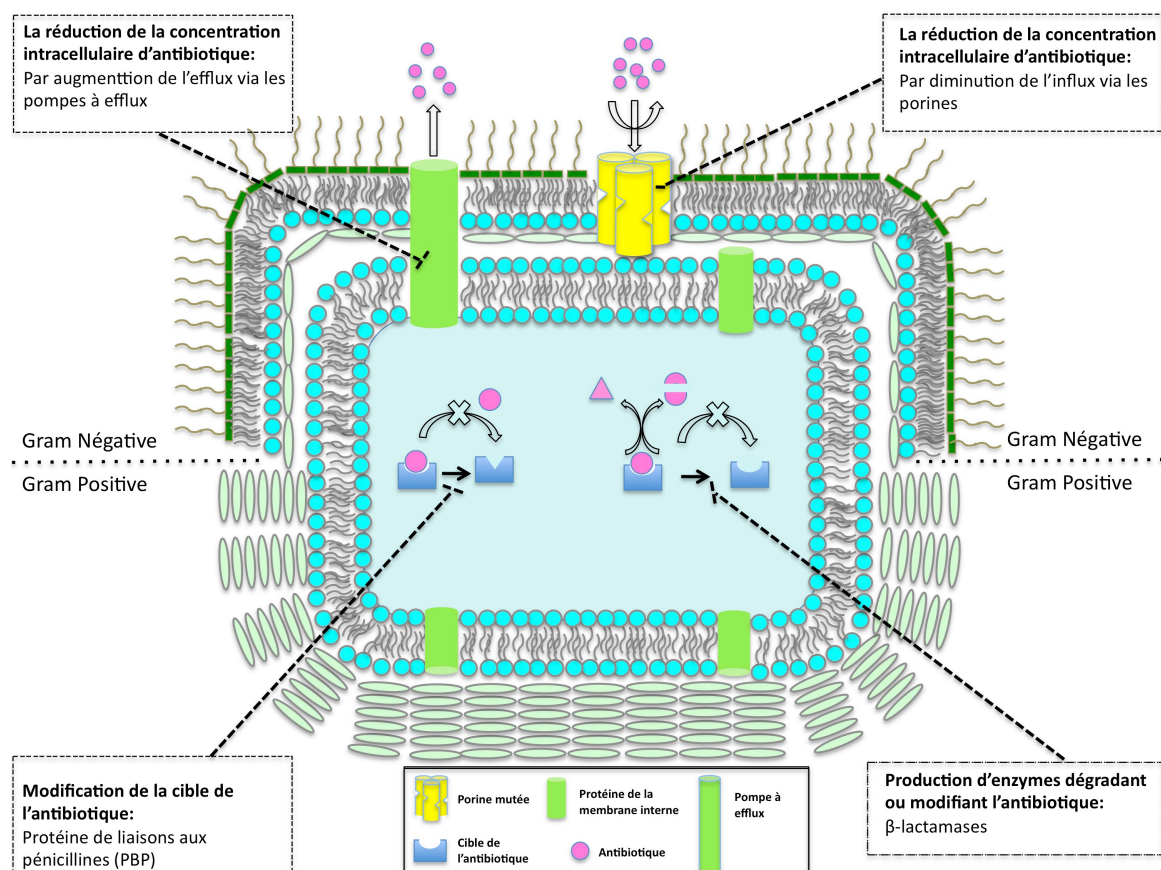


Figure 11: Une représentation schématique des trois mécanismes de résistance chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif.

II-7.1: Inactivation des antibiotiques par des enzymes

La production d'enzymes dégradant ou inactivant les antibiotiques est un des mécanismes de résistance les plus répandus. L'exemple typique est celui des β -lactamases et métallo- β -lactamases, qui hydrolysent par voie enzymatique les antibiotiques du type β -

lactames. Ces enzymes sont sécrétées dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram-négatif, où elles cliveront le cycle β -lactame de ces antibiotiques. Ceci conduira à une perte de leur activité. Un autre exemple est celui des aminoglycosides et des chloramphénicols, qui sont inactivés par les O-phosphotransférases, les O-acétyltransférases, les O-adényltransférases et les N-acétyltransférases ²².

II-7.2: Modification de la cible des antibiotiques

Des mutations au sein de la cible d'un antibiotique pourront largement affecter l'affinité pour ce dernier, et donc entraîner une perte de son activité. Une illustration de ce mécanisme est la mutation au sein des protéines de liaison aux pénicillines (PBP), sur lesquelles agissent les beta-lactames ²³. Des mutations sur la topo-isomérase (cible des fluoroquinolones) ou le ribosome (cible des macrolides) ont également été rapportées.

II-7.3: Réduction de la concentration intracellulaire des antibiotiques

La réduction de la concentration en antibiotiques au niveau de leur site d'action est un des mécanismes contribuant de façon majeure à la multi-résistance. Ce mécanisme fait appel soit aux pompes à efflux, soit à la modification de leur influx *via* les porines générales, soit au deux. L'extrusion d'une drogue par une pompe à efflux est un mécanisme actif qui réclame un apport d'énergie soit sous la forme d'une force proton motrice, soit sous la forme d'ATP ²⁴. La réduction de l'influx d'un antibiotique au travers des porines générales est, quant à elle, un phénomène passif, puisqu'aucune source d'énergie n'est requise. Dans de nombreux cas, on observe une synergie entre ces deux mécanismes, le second étant, chez les bactéries à Gram-négatif, requis pour que le premier soit viable ²⁵.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude structurale des porines générales et de leur rôle dans le mécanisme de la résistance bactérienne, en particulier. Dans la suite du manuscrit nous nous focaliserons donc sur la présentation de cette famille de protéines.

II-8: Architecture des porines

C'est grâce à la cristallographie aux rayons X que la grande majorité des structures tridimensionnelles des porines ont pu être dévoilées¹². D'autres techniques ont été également exploitées pour tirer de l'information structurale à haute résolution sur les porines, notamment la microscopie électronique (travaux de Sass et *al* sur OmpF)²⁶, et la résonance magnétique nucléaire (travaux de Fernandez et *al* sur OmpX)²⁷.

Les porines générales sont des transporteurs non-spécifiques généralement exprimées sous la forme de trimères. Certaines porines sont cependant exprimées sous la forme de monomères, notamment OmpG chez *E. coli* ou MOMp chez *Campilobacter jejuni*. Quelque soit le degré d'organisation quaternaire, chaque monomère de porine se replie sous la forme un tonneau β composé d'un nombre pair de feuillets β antiparallèles. Le nombre de feuillets β varie selon le type de porine considéré. Les porines générales comme OmpF possèdent 16 feuillets β , alors que les porines spécifiques comme LamB en possèdent 18 (Figure 12)²⁸. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous focaliserons sur les porines générales, qui sont des transporteurs non spécifiques.

Dans le tonneau β , les brins sont inclinés selon un angle de 20 à 45° par rapport à l'axe perpendiculaire à la membrane, et sont reliés par de longues boucles extracellulaires et de courts tournants périplasmiques. Parmi les boucles externes, la boucle L3 est la plus longue et elle se replie dans le canal délimité par le tonneau β , entraînant la formation d'une zone de constriction à mi-hauteur²⁹. Au niveau de cette zone, on observe une répartition asymétrique des charges. Tandis que la boucle L3 porte principalement des acides aminés chargés négativement, la région du tonneau β qui lui fait face, appelée région anti-L3, présente surtout des acides aminés chargés positivement. En fonction du nombre et du rapport entre les charges distribuées sur la boucle L3 et dans la région anti-L3, un champ électrostatique est généré, qui est à l'origine de la sélectivité ionique. Les résidus hydrophiles qui tapissent le long du canal le moduleront aussi.

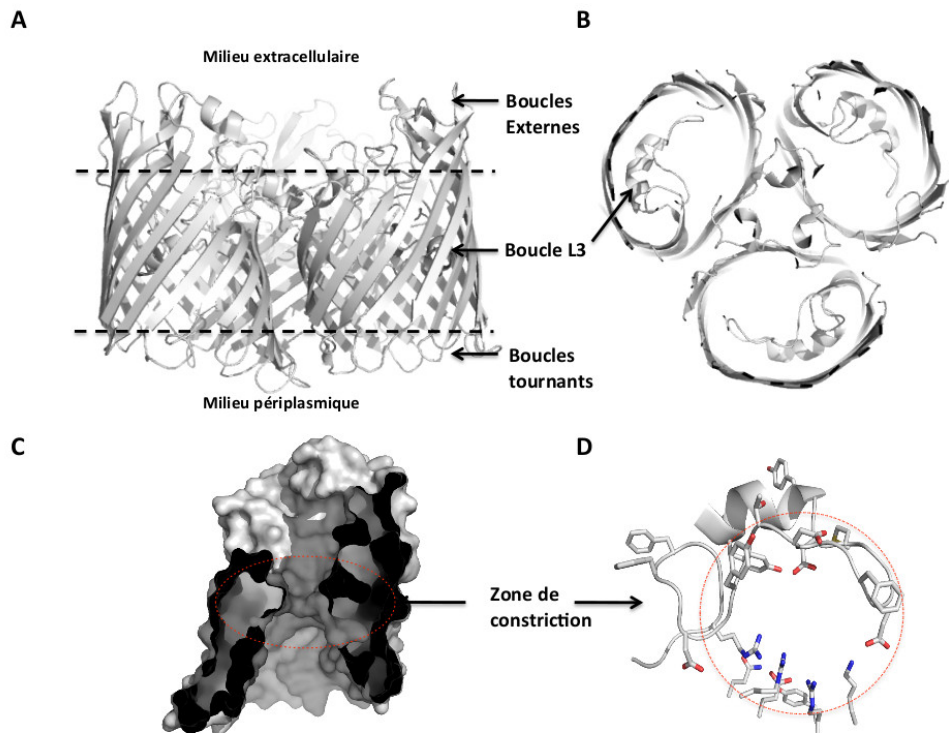


Figure 12: Structure cristallographique d'OmpF, la porine majeure d'*E. coli* (code PDB: 1OPF). A/ Les structures secondaires du trimère d'OmpF sont représentées en gris, vue le long de la membrane. Les deux traits (en pointillés noirs) délimitent la partie transmembranaire composée de 16 feuillets β antiparallèles. Les huit boucles externes sont exposées du côté extracellulaire et les huit tournants sont exposés du côté périplasmique. B/ La structure tridimensionnelle du trimère d'OmpF est représentée vue du côté extracellulaire. Dans cette orientation, la boucle interne (L3) est également visualisée au milieu du canal. C/ La structure monomérique d'OmpF est représentée, vue de l'intérieur du canal et le long de la membrane, en mode surface. La zone de constriction est localisée en pointillés rouges. D/ Les résidus chargés dans la zone de constriction sont représentés, vus du côté extracellulaire.

II-9: Régulation de l'expression des porines

Chez *E. coli*, trois porines non spécifiques ont été décrites (OmpC, OmpF et PhoE) dont l'expression relative répond aux conditions environnementales. Le taux d'expression de ces porines est très finement régulé. Chez l'homme, *E. coli* est souvent isolée dans l'intestin, où elle est assujettie à des conditions physico-chimiques très particulières. On note en particulier la présence de sels biliaries (4 à 16 mM), un pH relativement basique (aux alentours de 8) et une température légèrement élevée (37°C). Dans ces conditions, une régulation positive de l'expression d'OmpC est observée³⁰. Il a été proposé que la régulation de l'expression relative entre OmpF et OmpC ait pour but de limiter la perméabilité membranaire, les canaux d'OmpC étant plus petits que ceux d'OmpF (7 à 9% de différence)³¹. La régulation de l'expression de ces deux porines a été caractérisée au niveau génétique. Elle fait appel à deux composantes protéiques EnvZ et OmpR³². Dans certaines conditions d'osmolarité, EnvZ se trouve dans sa forme phosphorylée, induisant l'activation du facteur de

transcription OmpR. Cela conduit à l'activation de la transcription d'OmpC et l'inhibition de celle d'OmpF. D'autres systèmes de régulation peuvent également agir sur la régulation de ces deux porines, notamment le système CpxA-CpxR,³³ impliqué dans la réponse au stress de l'enveloppe, et le système basé sur les ARN antisens micC et micF, qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle²⁴. Il est intéressant de mentionner que dans des conditions anaérobiques, OmpC est également la porine majoritairement exprimée par *E. coli*³⁴. La porine PhoE, quant à elle, est spécifiquement exprimée dans des conditions de carence en phosphate⁷. De même, celle de LamB répond à des conditions de carence en carbohydrates. LamB sera non seulement capable de transporter le maltose mais également d'autres sucres de plus petite taille tels que le glucose³⁵.

II-10: Évolution des porines

Les boucles externes des porines sont exposées à la surface des bactéries et elles pourront donc entrer en contact avec diverses composantes du milieu extracellulaire : les anticorps, les phages, les colicines, les antibiotiques, etc. Par exemple, OmpF participe à la reconnaissance du phage K20³⁶ et des colicines³⁷, tandis que LamB est un récepteur du phage lambda³⁵. Une étude comparative des séquences des boucles externes de porines, provenant soit de souches bactériennes différentes, soit appartenant à la même espèce, a montré une variabilité significative dans la séquence des boucles externes¹². Ceci suggère une évolution rapide de la structure de ces boucles en réponse aux pressions sélectives du milieu. De même, certaines conditions de carence pourront induire des mutations au sein des porines. Une étude a ainsi montré qu'en cultivant *E. coli* dans un milieu où la seule source de carbone est un lactose « disaccharide », des porines OmpF présentant des mutations dans leur zone de constriction sont exprimées. Il s'agit de délétions dans la boucle L3, au niveau de Arg82 et Asp113. Celles-ci permettront un élargissement du canal, favorisant ainsi la diffusion du lactose³⁸.

II-11: Rôle des porines dans la signalisation transmembranaire

Récemment, les travaux de Housden et *al.* ont levé le voile sur une nouvelle fonction des porines dans la signalisation transmembranaire d'*E. coli*³⁹. Ce mécanisme, qui implique la translocation *via* OmpF et OmpC d'un fragment peptidique non structuré, « la colicine », détourne cette dernière de son rôle principal. En effet, les colicines sont des toxines protéiques produites par des bactéries pour se défendre contre des souches bactériennes semblables. Les

colicines peuvent exploiter différents modes d'action. Les colicines colE, par exemple, sont des nucléases non spécifiques qui pourront dégrader l'ADN ou l'ARN de la bactérie cible. L'implication des porines dans le mécanisme de transport de la colicine E3 est illustrée ci-dessous dans figure 13.

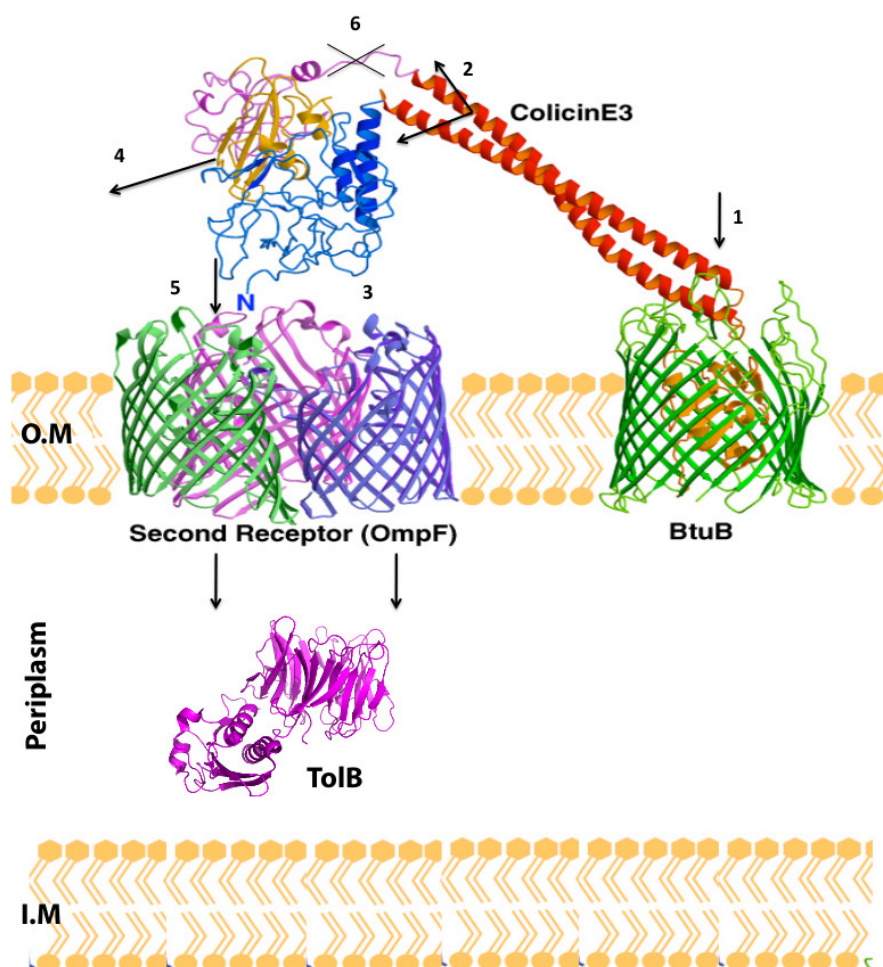


Figure 13: Une représentation schématique du mécanisme de translocation de la colicine à travers OmpF. (Figure adaptée de ³⁹). L'étape (1) est essentielle pour positionner la colicine à la surface de la cellule. Cette étape implique la fixation du domaine central de la colicine sur le récepteur de la vitamine B12 (BtuB). Les étapes (2-5) concernent la translocation du domaine intrinsèquement non structuré IUTD « Intrinsically Unstructured Translocation Domain » à travers OmpF. Ce domaine composé de 83 acides aminés va permettre d'introduire un épitope fixant TolB, appelé TBE (TolB Binding Epitope), dans le périplasme à travers les porines OmpF et/ou OmpC. Cet épitope, composé de 16 acides aminés, est positionné au centre de l'IUTD. Plusieurs sites d'interactions, de nature électrostatique au sein du canal des porines OmpF et OmpC, sont identifiés et permettent de diriger l'épitope jusqu'au périplasme. La séquence TBE interagit par la suite avec TolB pour induire l'entrée de la colicine dans la cellule. La dernière étape (6) implique le clivage protéolytique du domaine C-terminal du domaine IUTD constitué de 96 résidus pour permettre son passage dans le canal d'OmpF.

II-12: Implication des porines dans la résistance aux antibiotiques

La plupart des études réalisées sur les porines au cours des dix années précédentes

ont utilisé *E. coli* comme modèle d'étude. Ces travaux ont démontré l'implication d'OmpF dans la diffusion passive des antibiotiques vers le périplasme bactérien ^{3, 8, 10, 12}. Ils ont également permis la mise en évidence de deux mécanismes principaux médiant l'implication des porines dans la résistance aux antibiotiques : l'altération du profil membranaire des porines et la modification des porines suite à des mutations spécifiques.

Pagès *et al* ont analysé le profil membranaire des porines sur 45 isolats cliniques d'*Enterobacter aerogenes* présentant une résistance aux β -lactames ⁴⁰. Ils ont ainsi montré que 44% de ces souches présentaient un déficit d'expression de leurs porines non spécifiques. Chez certaines souches, une activité β -lactamase élevée a été détectée, mais pas chez toutes, ce qui suggère que l'altération du profil d'expression des porines joue un rôle dans la résistance de ces isolats cliniques aux β -lactames. Une autre étude a montré la répression rapide de l'expression des porines chez *E. aerogenes* lorsque cette souche est traitée par l'imipénème. La disparition des porines est corrélée avec une diminution de la susceptibilité des bactéries aux antibiotiques de type β -lactames. Ce mécanisme étant réversible, l'arrêt du traitement entraîne la réapparition des porines au sein de cette souche, qui redevient alors sensible aux β -lactames ⁴¹.

La régulation de l'expression des porines par substitution est un autre mécanisme exploité par les bactéries pour résister aux traitements antibiotiques. Des études menées sur des isolats cliniques de *K. pneumoniae* ont montré une surexpression de la porine OmpK37, qui présente un canal moins large que celui d'OmpK35 et OmpK36, les porines exprimées par les souches sauvages. Cette substitution mène à une augmentation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de nombreux antibiotiques, et notamment les β -lactames.

Enfin, il a été rapporté que des porines modifiées peuvent être exprimées, dont les propriétés de translocation seront affectées afin de réduire l'influx d'antibiotiques. Ce sont les variantes d'une porine donnée exprimées par des isolats cliniques. Des mutations au sein du canal pourront induire un rétrécissement de celui-ci (contraintes stériques), associé ou non à une modification de la répartition des charges (filtres électrostatiques). Un des sites de mutation privilégié sera donc la boucle L3. Une étude sur des isolats cliniques de *E. aerogenes* a montré que l'expression d'une variante d'OmpF présentant une mutation unique sur sa boucle L3 (G119D) entraîne une diminution d'un facteur 3 de sa conductance ⁴². Des mesures de CMI sur ce mutant ont également montré une sensibilité réduite aux céphalosporines ⁴³.

II-13: Études fonctionnelles

Différentes approches méthodologiques ont été exploitées au cours de ces dernières décennies afin d'étudier la fonction des porines. Parmi celles-ci, on compte l'électrophysiologie et la dynamique moléculaire, que nous avons également utilisées au cours de cette thèse. En quelques mots, les études d'électrophysiologie sont réalisées sur des porines reconstituées dans des bicouches lipidiques planes. Cette méthode permet d'étudier la translocation de solutés au travers des porines grâce à la compétition entre ceux-ci et les ions présents dans le solvant^{3, 8, 12, 44-46}. Ce type d'étude peut être mené à l'échelle de la porine unique, avec une résolution en temps de l'ordre de la milliseconde. La dynamique moléculaire, quant à elle, permet d'accéder à des échelles de temps plus courtes, mais réclame que la structure tridimensionnelle de la porine d'intérêt ait été résolue par cristallographie aux rayons X au préalable. Différentes études de dynamique moléculaire ont été menées sur OmpF, notamment celle de Roux et al⁴⁷ qui a permis de montrer l'efficacité de cette porine dans la perméation des cations, même à basse concentration en sel (μM). Dans ces simulations, la zone de constriction est apparue extrêmement stable. Une étude conjointe d'électrophysiologie et de dynamique moléculaire a également permis de démontrer la forte solidarité entre ions et acides aminés chargés longeant le canal, en particulier l'Asp113⁴⁸.

II-14: *Providencia stuartii*, l'organisme d'étude

Notre thèse s'est focalisée sur les propriétés structurales et fonctionnelles de deux porines non spécifiques de *Providencia stuartii* un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans des infections nosocomiales. Dans cette section, nous justifions le choix de ce microorganisme comme modèle d'étude.

II-14.1: La famille des entérobactéries

P. stuartii appartient à la famille des entérobactéries, lesquelles sont des bacilles à Gram-négatif. Les entérobactéries occupent une place importante en infectiologie humaine, qui s'explique en partie par la variété des espèces qui composent cette famille. Les entérobactéries sont souvent isolées dans le tube digestif de l'homme et des animaux, mais

elles prolifèrent également dans l'environnement (sols et eaux). Parmi les souches entérobactériennes les plus fréquemment impliquées en infectiologies humaines, on retrouve les 12 genres suivants : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia*. Toutes sont dotées de mobilité grâce à une ciliature péritriche (flagelles) à l'exception de *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia*. La plupart possèdent des fimbriae ou des pili, *i.e.* des excroissances de leur membrane externe qui permettent l'adhésion aux surfaces à coloniser. Les entérobactéries sont également caractérisées par des exigences multi nutritionnelles réduites, qui leur permettent de proliférer dans des milieux ayant une source de carbone unique, par exemple le glucose.

II-14.2: Les infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont des infections contractées au sein d'un établissement de santé. Ce type d'infection peut être d'origine exogène ou endogène. Dans le cas des infections endogènes, les pathogènes sont présents chez le patient avant l'hospitalisation et font partie de sa flore commensale. Dans le cas des infections exogènes, le patient entre en contact avec de nouveaux microorganismes au cours de son hospitalisation. Les infections nosocomiales les plus fréquentes sont des infections urinaires contractées lors d'un sondage urinaire ou après la mise en place de cathéters. Les infections nosocomiales se distinguent des infections communautaires par une résistance aux antibiotiques plus élevée. En effet, la pression de sélection est plus élevée au sein des unités de soin.

II-14.3: Le genre *Providencia*

Providencia constitue, avec les genres *Proteus* et *Morganella*, la tribu des *Proteae* dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Providencia* est constitué de cinq espèces distinctes: *P. alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* et *P. stuartii*⁴⁹. Ces espèces produisent des désaminases (tryptophane désaminase et phénylalanine désaminase) qui catalysent les réactions de désamination oxydative des acides aminés. Elles sont souvent isolées dans des infections urinaires, respiratoires hautes ou des bactériémies (circulant dans le sang). Parmi ces souches, mais aussi au sein de la famille des entérobactéries, *Providencia stuartii* est l'espèce la moins susceptible aux β -lactames de troisième génération. Elle est donc une souche idéale pour étudier les mécanismes de résistance à ce type d'antibiotiques⁵⁰.

II-14.4: Mécanismes de résistance associés à *Providencia stuartii*

De par la présence dans son génome d'une β -lactamase de type C (AmpC), *P. stuartii* est naturellement résistante aux tétracyclines, pénicillines et aux céphalosporines de première et deuxième générations. Elle reste cependant sensible aux céphalosporines et carbapénèmes de dernière génération, parmi lesquels l'aztréonam, l'imipénème et le méropénème. Une étude sur des isolats cliniques de *P. stuartii* a montré que 53% des souches présentent un phénotype ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase) ⁵¹. Les ESBL caractérisées chez *P. stuartii* sont des serine- β -lactamases de classe A (TEM, SHV, CTX-M, PER et VEB) ^{52, 53}, très actives sur les pénicillines, mais beaucoup moins sur les céphalosporines. Il a été également montré que la résistance de certaines souches est associée à la production de métallob- β -lactamases de classe B (VIM et IPM) ^{54, 55}, une classe d'enzymes actives sur les céphalosporines et les carbapénèmes. D'autres mécanismes enzymatiques ciblant les aminoglycosides et les macrolides, ont été rapportés ^{56, 57}. Le rôle des porines dans la diminution de la susceptibilité de *P. stuartii* aux antibiotiques est également documentée ⁵⁸, ce qui s'associe soit à la sous-expression des porines, soit à des mutations en leur sein ^{3, 59-61}.

II-14.5: Rôle des porines de *P. stuartii* dans la résistance aux antibiotiques

Deux porines générales non spécifiques ont été identifiées dans le génome de *P. stuartii*, i.e. Omp-Pst1 et Omp-Pst2 ⁴⁴. Omp-Pst1 est la porine majoritairement exprimée par *P. stuartii* et il a été montré qu'elle contribue de façon majeure à la pénétration des antibiotiques de type β -lactames. Le tableau 1 rapporte les résultats de Tran et al démontrant l'implication d'Omp-Pst1 dans la résistance de *P. stuartii* aux β -lactames ⁴⁴. En bref, une souche d'*E. coli* mutante, dépourvue de ses porines générales, a été utilisée comme modèle et contrôle. Les valeurs MIC sur cette souche sont initialement élevées, mais diminuent drastiquement quand Omp-Pst1 et Omp-Pst2 y sont clonées et exprimées (Δ Omp8 Omp-Pst1 et Δ Omp8-Omp-Pst2). Cette diminution est plus importante d'un facteur de deux pour Omp-Pst1 que pour Omp-Pst2 (Tableau 1), suggérant un rôle plus essentiel pour la première que pour la seconde dans la translocation des β -lactames. Tran et al ont également étudié la susceptibilité aux antibiotiques d'isolats cliniques provenant de patients traités pour des infections à *P. stuartii* à l'hôpital universitaire de Nîmes. Parmi leur sélection de souches, deux isolats cliniques ressortent Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16, qui présentent les phénotypes de multi-résistances les plus élevées et les plus larges. Ces souches, isolées sur

des patients ayant subi plusieurs traitements à l'imipénème et dont la situation s'est aggravée conduisant à la mort d'un des deux patients, présentent des MIC très élevées en comparaison à la souche de référence (ATCC) ⁶² (Tableau 1).

Strains	Minimum Inhibitory Concentration (µg/ml)			
	Imipenem	Ertapenem	Meropenem	Cefatizidine
<i>P. stuartii</i> ATCC	2	<0.06	<0.06	<0.06
<i>P. stuartii</i> Nea16	8	4	4	>512
<i>P. stuartii</i> 99645	4	1	1	>512
<i>E. coli</i> ΔOmp8	0.25	4	n/a	4
<i>E. coli</i> ΔOmp8 pG-Omp-Pst1	0.25	1	n/a	0.5
<i>E. coli</i> ΔOmp8 pG-Omp-Pst2	0.25	2	n/a	2

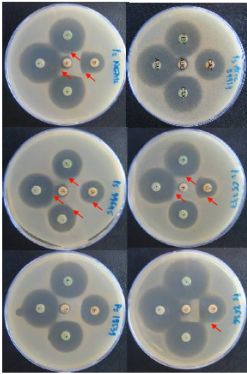


Tableau 1: La mesure de la concentration minimale inhibitrice (MIC) est illustrée pour deux espèces bactériennes (*P. stuartii* et *E. coli*), en réponse à différents antibiotiques de type β -lactames. (Tableau modifié de Tran *et al*⁶⁴). En allant de haut en bas : la souche sauvage de *P. stuartii* (ATCC) montre une susceptibilité envers la plupart des antibiotiques représentés dans le tableau 1, à l'exception de l'imipénème. Les deux isolats cliniques de *Providencia stuartii*, Nea16 et 99645 sont associés à une augmentation de leurs valeurs de MIC pour tous les quatre antibiotiques représentés ci-dessus. Cette tendance est plus marquée pour Nea16 que pour 99645. La souche d'*E. coli* ΔOmp8, dépourvue de ces porines générales dans la membrane externe, montre également une augmentation des valeurs de MIC pour la plupart des antibiotiques représentés. Suite à l'expression d'Omp-Pst1 ou d'Omp-Pst2 au sein de cette même souche, une diminution des valeurs de MIC est observée. Cette diminution est d'autant plus marquée pour Omp-Pst1 que pour Omp-Pst2. À droite du tableau 1, une illustration de la technique de disques imbibés d'antibiotiques, qui a été employée pour déterminer les valeurs de MIC.

Enfin, ces auteurs ont observé une diminution progressive de l'expression des porines lorsque ΔOmp8-Omp-Pst1 et ΔOmp8-Omp-Pst2, sont cultivées à des concentrations croissantes d'antibiotiques (Figure 14). Leurs résultats, basés sur des mesures de valeur de MIC, ont permis de conclure à l'existence d'une corrélation entre la susceptibilité de ces bactéries aux antibiotiques et le niveau d'expression des porines. Puisque l'ajout d'inhibiteurs de pompes à efflux (tels que le PAβN), de carbapénémases (tels que l'EDTA) et de céphalosporinases (tels que le clavulanate (CLA)) n'affectent pas les MIC observées, les auteurs concluent en une contribution substantielle des porines dans les phénotypes de résistances intrinsèque ou induits observés chez *P. stuartii* (Tableau 2). Les auteurs suggèrent ainsi une contribution importante des porines dans la résistance aux antibiotiques car ils permettent d'exclure l'action de pompes à efflux ou d'enzymes de type β -lactamases.

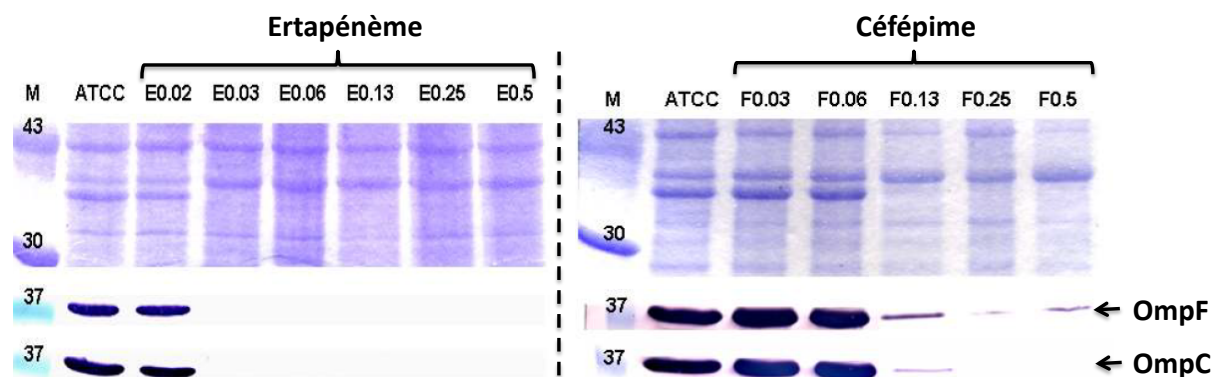


Figure 14: La diminution de l'expression des porines contribue à la résistance acquise de *P. stuartii* aux antibiotiques de type β -lactames. (Figure modifiée de Tran *et al* ⁴⁴). Les deux gels SDS Page représentés ci-dessus sont obtenus suite à la migration des extraits cellulaires provenant des souches bactériennes de *P. stuartii*, sauvage (ATCC) et mutantes (E et F). Les souches mutantes ont été sélectionnées après avoir subi les bactéries à une mise en culture en présence d'un gradient de concentration d'antibiotiques de type β -lactames, dont l'ertapénème (E 0,02; E 0,03; E 0,06; E 0,13; E 0,25 et E 0,5) et la céfépime (F 0,03; F 0,06; F 0,13; F 0,25 et F 0,5). L'expression des porines est ensuite identifiée par immuno marquage, suite à l'ajout des anticorps « anti-OmpF » et « anti-OmpC » en Western blot. Ces anticorps qui ciblent principalement les porines d'*E. coli*, OmpF et OmpC, sont également capables de reconnaître les épitopes des porines de *Providencia*. Les gels montrent que les souches mutantes présentent une sous-expression de leurs porines majoritaires en comparaison avec la souche de référence (ATCC). L'ertapénème induit une sous-expression de ces porines à partir d'une concentration de 0.03 μ g/ml (gel de gauche) alors que la céfépime ne montre un effet similaire qu'à partir de 0.13 μ g/ml (gel de droite).

Strains	Minimum Inhibitory Concentration (μ g/ml)					
	Imipenem	Ertapenem	Cefepime	Cefatizidine	Cefoxitine	Chloranphenicol
<i>P. stuartii</i> ATCC	2	<0.06	<0.06	<0.06	2	32
<i>P. stuartii</i> ATCC +PA β N	2	<0.06	<0.06	<0.06	2	8
<i>E</i> 0.5	8	16	0.25	0.5	64	32
<i>E</i> 0.5 +PA β N	8	16	0.13	0.25	64	8
<i>E</i> 0.5 +EDTA	8	16	0.13	0.25	64	n.d
<i>F</i> 0.5	4	2	8	16	64	32
<i>F</i> 0.5 +PA β N	4	2	8	16	64	16
<i>F</i> 0.5 +CLA	n.d	n.d	8	16	64	n.d

Tableau 2: Les porines sont des contributeurs majeurs dans la résistance aux antibiotiques de type β -lactames. En allant de haut en bas : le premier quadrant en pointillés montre les valeurs de MIC mesurées, suite à l'ajout des différents antibiotiques de type β -lactames, sur des souches de *P. stuartii* sauvage (ATCC), en absence et en présence du PA β N, respectivement. Les deux autres quadrants en pointillés montrent les valeurs de MIC mesurées, suite à l'ajout des différents antibiotiques de types β -lactames, sur des souches de *P. stuartii* ayant une sous-expression de leur porines (E0.5 et F0.5). Des mesures en présence ou absence de PA β N (inhibiteur des pompes à efflux), de l'EDTA (Inhibiteur des métallo- β -lactamases hydrolysant les carbapénèmes) et du CLA (Inhibiteur des β -lactamases hydrolysant les céphalosporines) sont également représentées.

II-14.6: Études fonctionnelles des porines de *P. stuartii*

Pour réaliser des études fonctionnelles sur les porines, la méthode de choix est l'électrophysiologie à l'échelle de la molécule unique. En pratique, un trimère de porine est reconstitué dans une bicouche lipidique artificielle puis perfusée par des antibiotiques, généralement introduits d'un seul côté de la membrane (cis vs. trans). La présence d'une porine dans une membrane séparant deux solutions ioniques permet d'enregistrer des courants puisque les ions pourront transiter au travers de la porine. L'addition d'un soluté transitant ainsi par la porine va induire une compétition qui se traduira par des chutes transitoires de courant. Le suivi des temps de blocage ainsi que de leur fréquence en fonction de la concentration permet la détermination des paramètres cinétiques de la translocation (K_{on} et K_{off}) spécifiques à chaque couple porine/soluté. En pratique, toutes les expériences d'électrophysiologies rapportées dans cette thèse ont été réalisées par le groupe de Mathias Winterhalter à l'université de Brèmes (collaboration active sur l'étude structurale et fonctionnelle des porines de *P. stuartii*) (Figure 15).

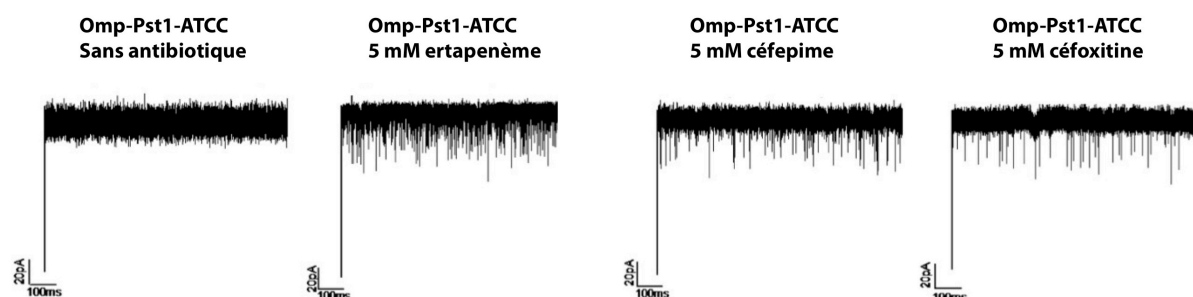


Figure 15: Mesure de la cinétique de translocation d'antibiotiques à travers Omp-Pst1 par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM). Les traces montrent des événements de translocation détectés pour l'ertapénème, céfépime et céfoxitine à une concentration finale de 5 mM contrairement au contrôle, sans antibiotique, où aucun saut du courant n'est détecté.

Lors de telles expériences, on réalise le plus souvent une expérience de voltage gating afin de vérifier l'état d'oligomérisation de la porine reconstituée. Les porines sont en effet connues pour subir une fermeture de leur canal à des voltages élevés, de l'ordre de 100 à 200 mV en moyenne, et une diminution en trois étapes du courant enregistré est une signature conclusive quant à l'oligomérisation d'une porine. C'est à la faveur d'une telle expérience que la forte sensibilité au voltage d'Omp-Pst2, laquelle subit la fermeture de son canal dès 20 mV, a été découverte. A notre connaissance, un voltage critique aussi bas est inédit chez les porines (Figure 16)⁴⁴.

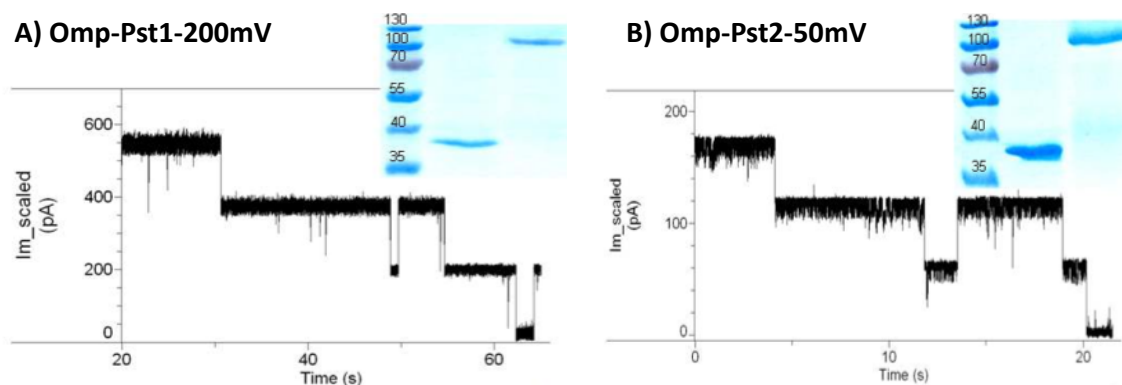


Figure 16: Mesure du voltage critique qui déclenche le « gating » chez Omp-Pst1 et Omp-Pst2 par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM). Chez Omp-Pst1, ce voltage est mesuré à 200 mV alors que chez Omp-Pst2 ce voltage est plutôt aux alentours de 10 à 50 mV. Ces mesures sont effectuées à pH6 en présence de 1 M KCl. Les gels associés aux traces représentent les porines Omp-Pst1 et Omp-Pst2 purifiées et qui migrent à 40 kDa sous forme monomérique (après chauffage de l'échantillon à 90 °C pour 2 min) et sous forme trimérique à 120 kDa (sans chauffage).

III- Biofilms, les cités microbiennes

III-1: Les biofilms, un profit ou un défi ?

Les biofilms sont des communautés microbiennes multicellulaires associées à des surfaces et enchâssées dans des matrices de polymères auto-sécrétées. Ils sont capables de coloniser les surfaces inertes, mais également les surfaces biologiques. Les bactéries au sein d'un biofilm sont communément plus résistantes que dans leur état planctonique, et présentent une tolérance plus forte face à l'antibiothérapie ou la réponse immunitaire. Le profil d'expression génique des bactéries y est adapté, de telle sorte que chaque bactérie participe et profite à/de l'établissement du biofilm. En santé humaine, les biofilms sont cependant un défi pour l'homme. Stoodly *et al* ont rapporté que 73% des infections bactériennes impliquent la formation des biofilms. Celle-ci est d'autant plus probable que des surfaces abiotiques sont fournies, tels les cathéters ou les implants ⁶³⁻⁶⁵. Les biofilms portés par l'homme ne sont cependant pas tous pathogènes. Le microbiote intestinal est un exemple typique de biofilm multi-colonies. Bénéfiques ou nocifs, les biofilms présentent des cycles de vie et des physiologies bien spécifiques, qui en font tout leur danger et tout leur attrait.

III-2: Mécanismes de développement

La transition d'un état planctonique à celui de biofilm est un processus dynamique qui comporte trois étapes essentielles (Figure 17) : l'adhésion des bactéries à une surface, la colonisation de cette surface par la structuration des bactéries en biofilm, et enfin, la

dispersion de ce dernier ⁶⁶.

III-2.1: L'adhésion

Le développement d'un biofilm commence par le déplacement des bactéries jusqu'à la surface à coloniser, soit passivement, soit activement (grâce à la propulsion active contribué par leurs flagelles). L'adhésion des bactéries à la surface se déroule alors en deux phases. La première, « précoce », est réversible et les bactéries conservent en particulier leur capacité à se déplacer par « swarming » (grâce aux flagelles) ou « twitching » (grâce aux pili) ⁶⁷. La seconde phase de l'attachement est « tardive » et irréversible ; les cellules perdent alors leurs composantes de mobilité cellulaires tels que les flagelles.

III-2.2: La colonisation

Cette étape suit l'adhésion irréversible à une surface et correspond à la croissance du biofilm, soit par division cellulaire, soit par recrutement d'autres bactéries planctoniques. On observe une première phase de maturation où les bactéries sont de plus en plus distantes les unes des autres dans les agrégats accrochés à des surfaces abiotiques (matériaux) ⁶⁴ ou biotique (muqueuses). Cette maturation s'accompagne par la sécrétion d'une matrice exopolymérique qui renforce la cohésion au sein du biofilm. Une deuxième phase de maturation dite « secondaire » prend alors place, qui se traduit par une croissance en multicouche et résulte en la formation de biofilms de taille parfois très importante (de l'ordre d'une centaine de microns dans chaque direction) ⁶⁶.

III-2.3: La dispersion et le détachement

Un biofilm structuré et mature ne l'est que pour un court laps de temps. Le relargage de cellules planctoniques à partir d'un biofilm permet à la bactérie de faire face à des environnements défavorables et de coloniser de nouveaux biotopes. Cette étape est caractérisée par un équilibre dynamique entre la perte de biomasse (mortalité et détachement) et la multiplication bactérienne. Elle impliquera la rupture des liaisons intercellulaires par digestion de la matrice d'exo-polymères, ce qui résultera en la libération des bactéries sous leur forme planctonique.

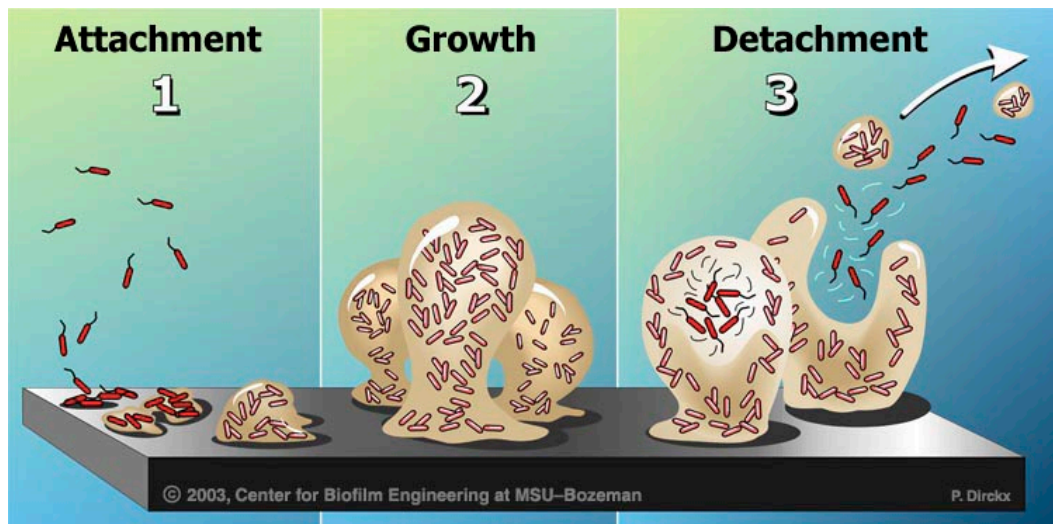


Figure 17: Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm bactérien (Figure adaptée avec la permission du centre d'ingénierie des biofilms « center for Biofilm Engeneering »). Les trois étapes du développement d'un biofilm bactérien sont représentées, allant de gauche à droite : (1) l'adhésion bactérienne à la surface, (2) la colonisation et la structuration du biofilm, (3) le détachement suivi de la dispersion des bactéries.

La formation, la croissance et la dissociation d'un biofilm sont en équilibre permanent. Il a été montré qu'un gradient de molécules signalétiques circulant dans le biofilm régule cet équilibre. Cette communication joue un rôle essentiel dans la différenciation du biofilm.

III-3: Communication au sein d'un biofilm « Quorum sensing »

Suite à la fixation de bactéries à une surface donnée (biotique ou abiotique), la synthèse de polymères et la multiplication cellulaire conduisent au développement d'une structure tridimensionnelle dotée d'une architecture complexe et très hétérogène, dont la composition varie selon les espèces et les conditions environnementales. Les bactéries enchâssées dans cette matrice subissent une régulation de leur expression génique et protéique différente de celle observée sous leur état planctonique, en réponse aux conditions du milieu mais aussi à des signaux intercellulaires. La communication chimique établie entre les bactéries au sein du biofilm est connue sous le nom de « quorum sensing ». Elle dépend de molécules « signal » libérées et transmises à travers cette matrice ⁶⁸⁻⁷¹. Grâce à ce langage chimique, les bactéries sont capables de s'adapter d'une manière collective aux variations environnementales.

III-3.1: Matrice extracellulaire complexe et hétérogène

Les bactéries présentes au sein d'un biofilm sont capables de synthétiser une matrice complexe et hétérogène (Figure 18). Cette matrice, qui représente 90% de la masse totale du biofilm, est responsable de la cohésion du biofilm ⁷². La matrice est avant tout une protection

contre la diversité des états de stress possibles. Selon les espèces, les conditions environnementales et l'état de développement du biofilm, la nature de cette matrice va drastiquement évoluer. Elle est constituée majoritairement de polysaccharides, d'acides nucléiques, de protéines, de lipides et d'eau. Tous participeront de son architecture, de sa densité, de sa porosité et de sa stabilité mécanique. La stabilité et l'intégrité du biofilm sont médiées par les interactions entre ses différentes composantes matricielles. Récemment Chapman et *al* ont démontré la participation de fibres amyloïdes dans la formation et la cohésion des biofilms ⁷³.

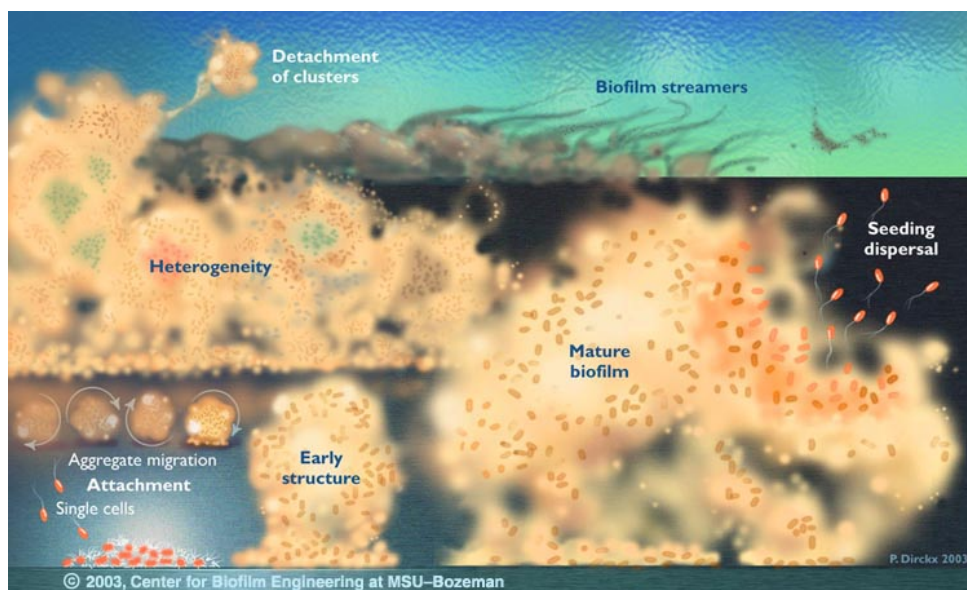


Figure 18: Illustration de l'hétérogénéité spatiale d'un biofilm. (Figure adaptée avec la permission du centre d'ingénierie des biofilms « center for Biofilm Engeneering »). Les premières étapes dans la formation d'un biofilm bactérien débutent par l'adhésion bactérienne sur une surface et se succèdent par le recrutement d'autres cellules pour consolider la structure de base du biofilm. À ce stade, les bactéries secrètent une matrice extracellulaire qui contribue à la maturation de cette structure. Allant de la surface jusqu'à la profondeur de ces structures, les bactéries ne présentent pas le même phénotype, traduisant une hétérogénéité au sein de ces édifices biologiques.

Au sein d'un biofilm, les bactéries font face à une hétérogénéité de composition selon qu'elles soient à la surface ou en profondeur de ces super structures. Dans les couches internes, la concentration en nutriments peut atteindre des niveaux très faibles du fait de la consommation de ceux ci par les bactéries des couches plus externes. Il a également été montré que les produits issus du métabolisme des bactéries, et qui se trouvent enchâssés dans la couche profonde, diffusent peu, ce qui pourra résulter en l'établissement de gradient de pH à l'intérieur de biofilm ⁷⁴. Les bactéries n'ont cependant aucune difficulté à s'adapter à ces micro-environnements. Le niveau d'expression protéique des bactéries au sein d'un biofilm est 50% plus faible que celui des cellules identiques à l'état planctonique ⁷⁵. La vie au sein

d'un biofilm est donc plus économique pour la bactérie d'un point de vue énergétique.

III-3.1.1: Fibres amyloïdes au sein d'un biofilm

Différentes études ont montré l'existence de fibres amyloïdes au sein de biofilms formés par différentes espèces bactériennes, notamment *E. coli* (Figure 19). Ces fibres jouent un rôle dans l'agrégation et la cohésion intercellulaires et sont nommés « curli ». Les premières mises en évidence ont été fournies sur *E. coli* et *B. subtilis*, chez lesquelles des fibres amyloïdes formant un réseau dense assure la structuration tridimensionnelle et le développement du biofilm^{73,76}.

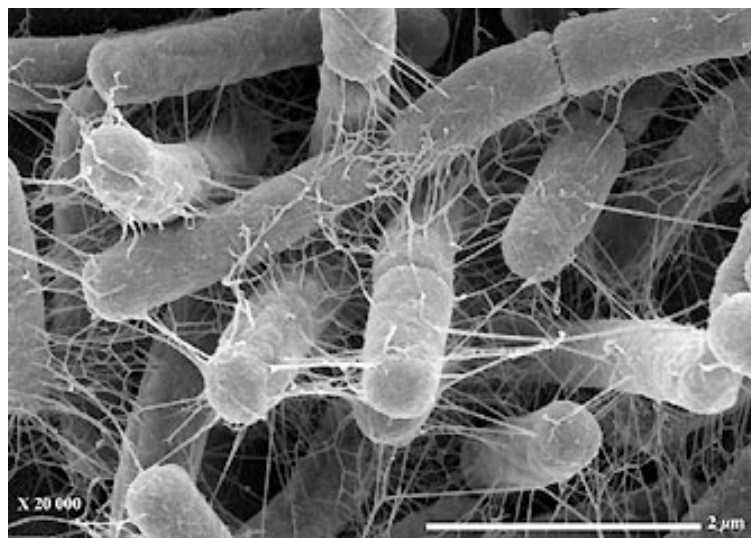


Figure 19: Photo de microscopie électronique à balayage montrant la production de curli chez *E. coli*. (Référence de l'image: Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur).

III-3.2: Interaction entre espèces

Les biofilms isolés dans les cas pathologiques, et plus généralement en dehors du laboratoire, peuvent correspondre à des associations de plusieurs espèces bactériennes. C'est ainsi que l'interaction intercellulaire au sein d'un biofilm joue un rôle déterminant dans le développement, l'architecture et la fonction de la communauté. Il est en effet admis que le phénotype d'une cellule peut affecter significativement le mode de vie des cellules voisines⁷⁷. D'un côté, des phénomènes de type syntrophie existent, dans lesquels deux espèces bactériennes interdépendantes nutritionnellement coexistent. D'un autre, certaines espèces peuvent rentrer dans une compétition pour les nutriments. Dans les deux cas, les bactéries sont capables de sécréter des composés qui inhibent ou favorisent la croissance des cellules voisines, régulant l'organisation spatiale spécifique à chaque biofilm. La présence de

plusieurs espèces dans un biofilm aura également un impact sur la nature physico-chimique de sa matrice extracellulaire. Les polymères synthétisés par plusieurs espèces bactériennes pourront en effet différer et la combinaison de leurs propriétés confèrera une stabilité mécanique spécifique au biofilm. Une étude récente de Lawrence et *al* a montré l'impact des interactions entre espèces sur l'évolution d'une communauté de cellules ⁷⁸. Cette étude a notamment montré qu'un plus grand nombre de variantes bactériennes émergent lorsque plusieurs espèces sont mises en culture ensemble. Malgré l'intérêt théorique des scientifiques pour mieux comprendre les interactions inter espèces, celles ci restent à ce jour mal caractérisées.

III-4: Biofilms et complications médicales associées

Les biofilms bactériens peuvent être impliqués dans des infections chez l'être humain. Comme nous l'avons déjà mentionné, ceux-ci pourront coloniser des surfaces abiotiques (matériel médical, organes artificiels), mais aussi des surfaces biotiques (épithélium). Les infections impliquant les biofilms résultent souvent de fortes antibio- et immuno-résistance. Lorsqu'elles seront contractées à l'hôpital, elles seront de surcroît nosocomiales. Un des cas le plus connu d'infection bactérienne chronique liée aux biofilms est celui des infections par *P. aeruginosa* soit dans le contexte d'une maladie génétique dévastatrice, la mucoviscidose, soit dans celui d'infections nosocomiales.

III-4.1: Infections associées au matériel implanté

Une des causes les plus fréquentes d'infections nosocomiales est la pose de matériels médicaux ou d'organes artificiels contaminés. L'incapacité à assurer l'absence de contamination est un des facteurs limitant, par exemple, le développement des cœurs artificiels. La preuve en a été fourni, dès 1982, par une équipe canadienne qui a du retirer en urgence un pacemaker dont les électrodes étaient infectées par des staphylocoques ⁷⁹. Plus généralement, de nombreuses infections nosocomiales surviennent lors de la pose d'un cathéter, en particulier un cathéter urinaire (25% des infections nosocomiales) ⁸⁰. Les entérobactéries des genres *Providencia*, *Escherichia* et *Proteus* sont en particulier fréquemment impliquées dans ce genre de cas. Pour ce qui est d'infections à des espèces du genre *Providencia*, leur activité uréase entraînera une alcalinisation de l'urine, laquelle résultera en la cristallisation de sels autour du biofilm bactérien ; on parlera donc de biofilm cristallins ⁸⁰. Dans ce genre de cas, la seule option pour sauver le patient est de remplacer le cathéter en urgence (Figure 20).

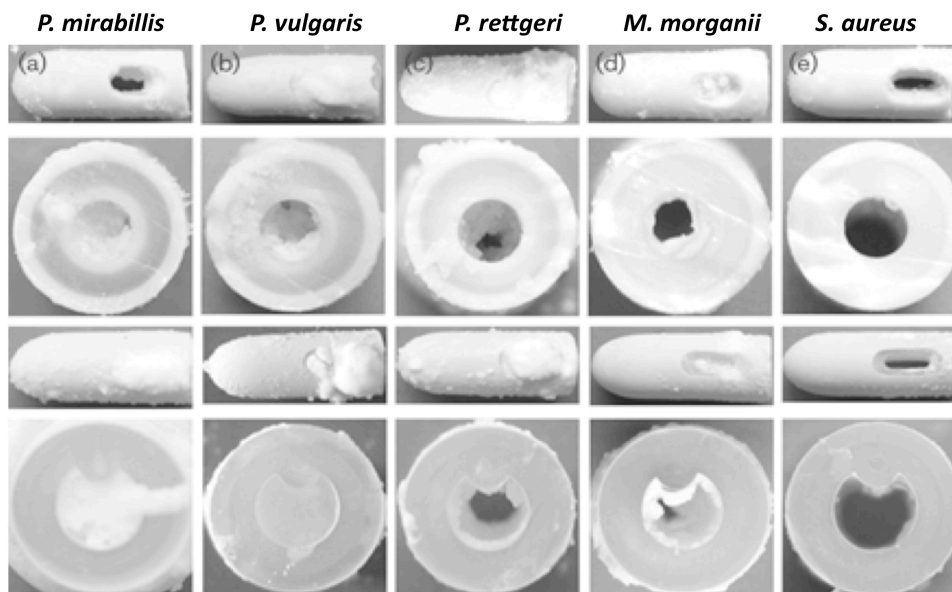


Figure 20: Biofilms cristallins formés dans des modèles de cathéters suite à leurs incubations avec différentes espèces bactériennes (Image modifiée de ⁸⁰). Allant de gauche à droite, les espèces bactériennes concernées sont : (a) *P. Mirabilis* RB6, (b) *P. vulgaris* SDM2, (c) *P. rettgeri* SDM1, (d) *M. morganii* RB15 et (e) *S. aureus*. Ces bactéries sont mises à incuber au sein des cathéters pendant plusieurs jours et résultent, pour certaines espèces représentées ci-dessus, d'une obstruction complète de lumen du cathéter.

III-4.2: Infections chroniques

Les infections bactériennes chroniques sont souvent le fait de biofilms ⁸¹. L'exemple le plus connu et le plus dramatique est celui de la mucoviscidose, une maladie génétique qui favorise les infections pulmonaires par *P. aeruginosa*. Les victimes de cette maladie meurent généralement jeunes, avant leurs 18 ans, du fait des dommages répétitifs par les traitements successifs avec des doses importantes d'antibiotiques.

III-5: Biofilms face aux antibiotiques

Les bactéries d'un biofilm sont capables de vivre à des concentrations très élevées d'antibiotiques. On parle de tolérance aux antibiotiques, plutôt que de résistance au sens où elle est réversible et non héritable. En effet, après remise en suspension des bactéries présentes au sein d'un biofilm, celles-ci retrouvent une sensibilité normale aux antibiotiques ⁸². Différentes explications ont été fournies pour expliquer cette tolérance. Intuitivement, la matrice englobant les bactéries constitue une barrière de diffusion qui devrait ralentir la pénétration des antibiotiques. Cependant, il a été montré que la diffusion des fluoroquinolones n'est pas affectée ⁸³. Les états de carence nutritionnelle subis par certaines bactéries du biofilm pourraient expliquer une protection artificielle des cellules vis à vis de l'effet des

antibiotiques, car un métabolisme réduit signifie une sensibilité réduite. L'environnement des bactéries au sein du biofilm pourra également induire l'activation de gènes conférant une résistance à tel ou tel antibiotique. Ainsi, il a été montré que les cellules d'*E. coli* et *P. aeruginosa* expriment des pompes à efflux lorsqu'elles sont au sein d'un biofilm ⁸⁴.

III-6: Thérapies « Anti-Biofilms »

Pour ralentir ou éviter la progression et la multiplication des biofilms, plusieurs stratégies peuvent être exploitées. On pourra ainsi:

i/ Inhiber l'adhésion des bactéries à la surface ^{85 86} .

ii/ Inhiber le quorum sensing pour éviter la maturation du biofilm. C'est en particulier le mode d'action de l'azithromycine lorsqu'il est prescrit à des patients infectés par *P. aeruginosa* ⁸⁷ .

iii/ Favoriser la dispersion du biofilm en cellules planctoniques afin de renforcer leur sensibilité à l'antibiothérapie. De telles molécules ont été décrites, notamment les norsperdimines, appartenant à la famille des polyamines produites par *B. subtilis*. On a aussi rapporté un effet bénéfique des acide aminés de la série D ^{88 89,90} .

iv/ Diminuer la tolérance du biofilm. L'état métabolique dormant de certaines bactéries au sein du biofilm les rend moins sensibles aux antibiotiques. C'est à cette problématique que des chercheurs de l'université de Boston se sont intéressés. En associant une source de carbone, par exemple du fructose ou mannitol, à l'antibiothérapie, les bactéries « dormantes » sont « réveillées » et ainsi rendues sensibles à cette dernière ⁹¹ .

Méthodologies

I- Biochimie des protéines membranaires

Plus d'un tiers des gènes code pour l'expression de protéines membranaires. Ces protéines participent à un grand nombre de processus essentiels, tels que les échanges transmembranaires d'ions, de solutés et de signaux métaboliques, l'association des cellules en tissus et la résistance aux toxiques. D'un point de vue structural et biochimique, elles sont cependant moins bien caractérisées que leurs homologues solubles, du fait des complications supplémentaires qu'introduit leur nature hydrophobe. Notre projet de thèse visant l'étude des propriétés structurales et fonctionnelles des porines de *P. stuartii*, nous avons dû relever plusieurs jalons et nous tenterons de l'exposer ici. En premier lieu, il a fallu résoudre la question du taux d'expression et du bon adressage à la membrane. Il a fallu ensuite extraire ces protéines de leur membrane tout en maintenant leur structure intacte, et de les purifier, ce qui a impliqué de les solubiliser grâce à des détergents. Ces derniers pouvant avoir un effet stabilisateur ou déstabilisateur sur la structure des protéines, nous avons dû identifier les meilleurs détergents pour nos porines. Il conviendra donc de la vérifier. Dans cette section, nous décrirons les approches utilisées au cours de cette étude et qui ont permis l'obtention de la structure des deux porines non spécifiques de *P. stuartii*, ainsi que celles de deux variantes d'Omp-Pst1 exprimées par des isolats cliniques.

I-1: Les détergents

Un détergent est une molécule constituée de deux parties, l'une présentant une affinité pour les milieux hydrophobes, et l'autre une affinité pour les phases aqueuses. Ainsi, les molécules de tensio-actif ont tendance à s'adsorber à l'interface liquide/air ou liquide/solide en gardant leur portion hydrophile baignée dans la phase aqueuse et leur portion hydrophobe en contact avec l'air ou le solide. Au-delà d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), le détergent n'est présent que sous forme monomérique dans une solution aqueuse. Dès que cette concentration est atteinte, le détergent s'oligomérise en agrégats appelés micelles et dans lesquelles les parties polaires sont en contact avec l'eau, tandis que les parties hydrophobes s'assemblent dans un cœur hydrophobe. Différents paramètres physico-chimiques peuvent affecter la CMC, notamment le pH, la force ionique, la température mais surtout la nature du tensio-actif utilisé. Ce dernier paramètre dépend essentiellement de la taille de sa chaîne hydrophobe, mais également de la charge du groupement hydrophile.

I-2: Retrait et échange des détergents

L'extraction d'une protéine membranaire de son environnement physiologique réclame d'utiliser des concentrations élevées en détergents. Leur présence en excès affectera cependant leur stabilité et leur propension à cristalliser. Il sera donc nécessaire de minimiser la quantité de détergent présente au cours de la purification et souvent, d'échanger les détergents utilisés à différentes étapes du processus. Trois méthodes pourront être utilisées à dessein :

i/ La première consiste à adsorber les molécules de détergent sur des billes de polystyrène hydrophobe (bio-beads). La solution contenant les protéines solubilisées sera ensuite séparée des billes par simple pipetage.

ii/ La deuxième méthode consiste à effectuer une dialyse de l'échantillon protéique contre un tampon sans détergent. Le choix du diamètre de la membrane dialysante (*cut-off*) est essentiel ; souvent il est conseillé d'utiliser un *cut-off* de 14 kDa ⁹². L'idéal est que par simple diffusion, seules les molécules libres de détergent (monomérique ou micellaire) traversent cette membrane, tandis que celles entourant la protéine sont retenues ainsi que les micelles. Le temps de dialyse nécessaire pour aboutir à une élimination optimale des molécules libres de détergents peut varier significativement selon le type de détergent utilisé ⁹³.

iii/ On pourra enfin échanger le détergent sur une colonne de chromatographie. Dans ce cas, la protéine est accrochée sur la colonne, puis subit un lavage en continu avec le nouveau détergent, ce qui permettra d'éliminer l'ancien. Dans ce genre de cas, il est important d'effectuer les lavages avec des pourcentages au moins 5 fois plus élevés en terme de CMC en nouveau détergent qu'en détergent ancien. La solution protéique est ensuite rincée puis éluée avec des tampons contenant le nouveau détergent à des valeurs légèrement supérieures à la CMC, par exemple 1.5 x CMC.

I-3: Méthodes de préparation des liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques, et qui miment l'environnement d'une membrane biologique. Leur champ d'application est très large, et inclue notamment la vectorisation de médicaments et l'incorporation des protéines

membranaires en vue d'études fonctionnelles. Le diamètre des liposomes peut varier de 20 nm à plusieurs dizaines de μm , selon la méthode de préparation. On distingue ainsi les liposomes unilamellaires formés d'une seule bicouche lipidique (LUV: Large Unilamellar Vesicle) des liposomes multilamellaires, qui en comportent plusieurs (MLV: Multi Lamellar Vesicle). Une autre classification se réfère au diamètre des liposomes et permet de distinguer les liposomes de petite taille (SUV: Small Unilamellar Vesicle), de grande taille (LUV) ou géants (GUV: Giant Unilamellar Vesicle). Chacun de ces types de liposomes est préparé selon une méthode différente. Suivant l'application ou le but expérimental, on utilisera l'une ou l'autre de celles ci. Les deux méthodes utilisées au cours de cette thèse sont celles de la réhydratation des films lipidiques ou du gonflement par voie électrique (electro-swelling). Elles sont présentées ci après.

Méthode d'hydratation des films lipidiques

Les lipides, solubilisés dans du chloroforme, sont déposés dans un tube en verre. Le solvant est alors éliminé grâce à un flux d'azote gazeux, puis le film réhydraté par addition d'une solution aqueuse et agitation au vortex ⁹². À ce stade, des vésicules de types multilamellaires et d'une taille hétérogène sont formées. Ces dernières possèdent plusieurs bicouches lipidiques concentriques séparées les unes des autres par du solvant. Plusieurs cycles de congélation et de décongélation sont alors appliqués, qui vont fragiliser les membranes et permettre l'obtention de liposomes unilamellaires (*freeze-thawing*). Ceux-ci possèdent encore une hétérogénéité de taille et devons être soumis à une extrusion pour être calibrés en taille. En général, on utilisera des membranes de polycarbonate pour l'extrusion. Les liposomes obtenus sont des LUV (100 à 500 nm de diamètre).

Méthode de gonflement par voie électrique ou « electro-swelling »

Dans cette méthode, une fine couche de lipides dissous dans du chloroforme est déposée sur une lame de verre fonctionnalisée par une couche conductrice de courant en ITO (Indium Tin Oxyde) ⁹⁴. Le solvant organique est éliminé par séchage puis recouvert par une solution de sucrose ou de sorbitol. Une deuxième lame ITO est alors utilisée pour couvrir la solution aqueuse, puis un courant électrique est appliqué entre les deux lames de verre. Ceci permet de gonfler le film lipidique et de le libérer dans la solution aqueuse sous la forme de liposomes unilamellaires. Les liposomes préparés par cette méthode sont des GUV et présentent un diamètre de 1 à 200 microns.

Les liposomes de grande taille (LUV ou GUV) sont susceptibles de subir diverses modifications au cours du temps, notamment des dégradations chimiques par oxydation des phospholipides, des agrégations, ou des fusions. Il sera donc nécessaire de travailler avec des solutions fraîches de liposomes. Celles-ci pourront cependant être stockées quelques jours à basse température (4 °C).

I-4: Méthodes d'incorporation des protéines membranaires au sein des protéoliposomes

Différentes méthodes existent pour incorporer des protéines membranaires dans une membrane liposomale ⁹⁵. Le taux d'incorporation dépendra de la méthode choisie mais également d'autres facteurs, par exemple la nature des lipides et des protéines utilisées, la nature du tampon, le pH, etc.

Incorporation de protéines membranaires dans les liposomes après dilution du détergent

Cette méthode consiste à ajouter directement la protéine solubilisée dans des micelles de détergents à une solution contenant des liposomes unilamellaires, mais pas de détergent. La dilution du détergent en dessous de sa CMC entraîne la dissociation des micelles en monomères. La protéine membranaire, hydrophobe, trouve alors refuge dans la bicouche lipidique des liposomes, échappant ainsi à l'agrégation et/ou la dénaturation. L'avantage de cette méthode est la simplicité de sa mise en œuvre quand son inconvénient majeur est l'absence de contrôle sur le taux et le sens d'incorporation des protéines. Un autre inconvénient est la précipitation possible des protéines sous l'effet d'une dilution trop brutale de la concentration en détergent. C'est en tous les cas cette méthode qui a été exploitée au cours de notre étude.

Incorporation de protéines membranaires dans des liposomes en présence de détergent

Cette méthode consiste en l'incorporation des protéines membranaires dans les liposomes en présence de micelles de détergent qui sont progressivement éliminées par adsorption sur des billes de polystyrène hydrophobes ou par dialyse. Si cette méthode maximise le taux d'incorporation des protéines, elle ne permet pas de mieux contrôler le sens d'insertion dans la bicouche lipidique.

Estimation théorique de la fraction de protéines membranaires insérées dans les liposomes

En connaissant le diamètre des liposomes ainsi que leur concentration, il est possible d'estimer d'une façon théorique le rapport de protéines membranaires insérées dans la membrane liposomale, selon la procédure suivante:

i/ Dans un premier temps, il est possible d'assigner un diamètre moyen aux liposomes préparés selon que l'une ou l'autre des deux méthodes décrites dans le paragraphe I.3 soit utilisées. Pour les LUV ce rayon dépend de la taille des membranes polycarbonate utilisées lors de l'extrusion ainsi que du nombre de cycle réalisé. Des mesures supplémentaires par diffusion dynamique de lumière (DLS) ont permis de confirmer l'homogénéité et la taille de ces vésicules en solution. Pour les GUV l'absence d'une étape de calibration rend l'hétérogénéité de ces vésicules plus marquée, et donc plus difficile à estimer de façon moyenne.

ii/ Dans un deuxième temps, nous avons calculé la concentration de liposomes à partir de la quantité de lipides utilisée au départ. Pour cela, il est important de connaître le nombre de molécules lipidiques présent au sein de la bicouche du liposome. En assimilant le liposome à une sphère creuse (Figure 21), les surfaces externe et interne sont données par les équations suivantes :

$$(1) \quad S_{\text{ext}} = 4 \pi r_{\text{ext}}^2$$

$$(2) \quad S_{\text{int}} = 4 \pi r_{\text{int}}^2 = 4 \pi (r_{\text{ext}} - d_b)^2$$

où r_{ext} est le rayon du feuillet externe du liposome, r_{int} le rayon du feuillet interne et d_b l'épaisseur de la bicouche lipidique. Nous avons fixé cette dernière à 5 nm, comme étant une moyenne approximative de l'épaisseur d'une bicouche membranaire ⁹⁶.

Ensuite, il est possible de calculer le nombre de molécules lipidiques (N) présentes dans la bicouche lipidique à partir des équations suivantes :

$$(3) \quad N_{\text{ext}} = \frac{S_{\text{ext}}}{S_{\text{lipi}}}$$

$$(4) \quad N_{int} = \frac{S_{int}}{S_{lipi}}$$

$$(5) \quad N_{bicouche} = N_{ext} + N_{int}$$

où N_{ext} est le nombre de molécules lipidiques présentes dans le feuillet externe du liposome, N_{int} le nombre de molécules lipidiques présentes dans le feuillet interne et S_{lipi} la surface occupée par la tête hydrophile d'une molécule lipidique. Appuyé sur les travaux de Winterhalter et al, nous avons attribué une surface de 0.717 nm² à la tête hydrophile des POPC⁹⁷. Connaissant le nombre de molécules lipidiques présent dans la bicouche d'un liposome ainsi que la concentration de lipides de départ (en considérant que tous lipides sont transformés en liposomes), il est possible d'estimer la concentration des liposomes en solution en molaire suivant la relation:

$$(6) \quad C_{lipo} = \frac{C_{lipi}}{N_{bicouche}}$$

iii/ Le ratio des porines par liposome (Figure 21 B) sera facilement déduit connaissant la concentration finale des protéines dans le milieu.

$$(7) \quad R_{prot/lipo} = \frac{C_{prot}}{C_{lipo}}$$

iv/ Le pourcentage de surface occupée par les porines à la surface d'un liposome (Figure 21 C) peut être calculé en utilisant l'équation suivante :

$$(8) \quad S_{occupée} = \frac{R_{prot/lipo} \times S_{prot}}{R_{prot/lipo} \times S_{prot} + S_{ext}}$$

où S_{prot} est la surface d'une protéine estimé en se basant sur sa structure cristallographique. Dans le cas de porines, cette surface a été calculée en assimilant le trimère à un cylindre de 6 nm de diamètre.

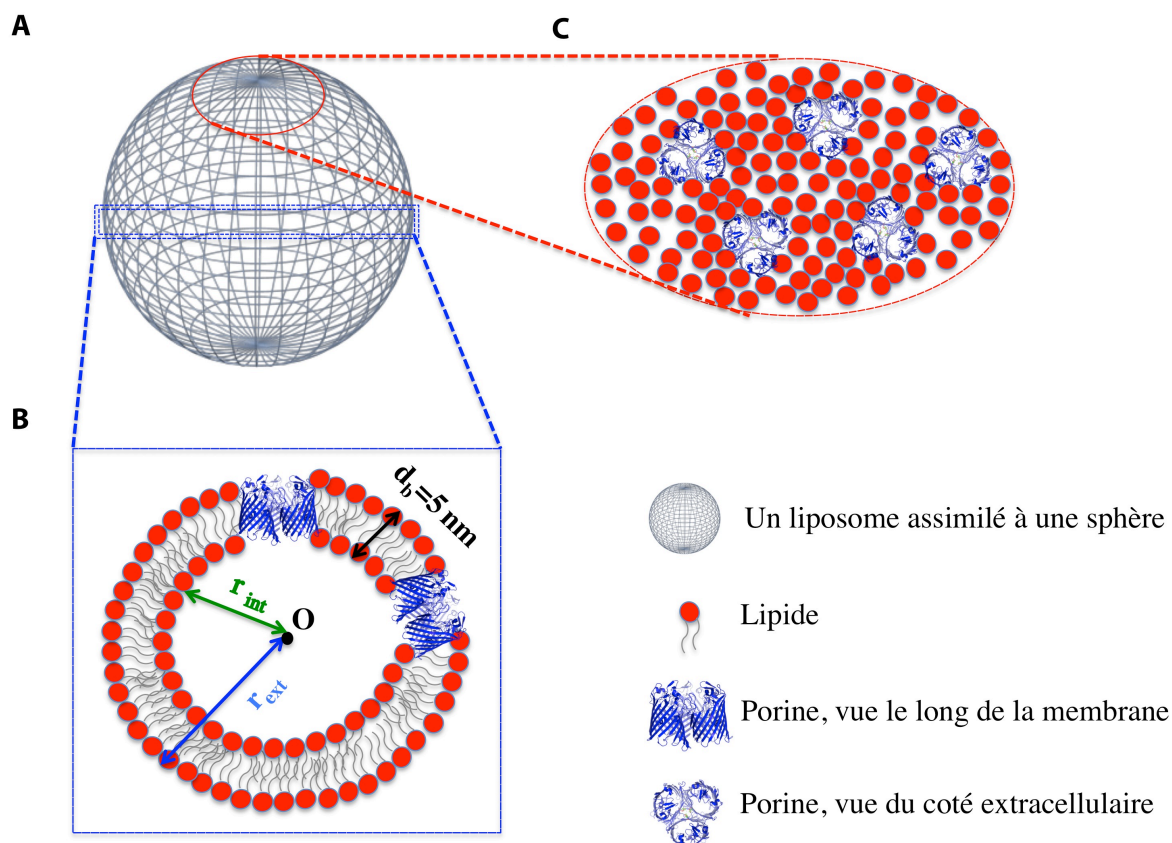


Figure 21: Estimation du nombre de porines insérées par liposomes. A/ Représentation schématique d'un liposome assimilée à une sphère creuse. B/ Une coupe transversale à travers un liposome révèle deux sphères, interne de rayon r_{int} et externe de rayon r_{ext} , séparées d'une bicouche lipidique de 5 nm d'épaisseur (d_b). Deux porines sont représentées au sein de cette bicouche, le long de la membrane C/ La surface externe d'un liposome est représentée vue du côté externe. Les têtes hydrophiles des molécules lipidiques sont illustrées par des sphères en rouge. Entre ces molécules lipidiques, quatre porines sont représentées, colorées en bleu et vues de leur côté extracellulaire.

Il faut noter que dans ces calculs, nous faisons l'hypothèse improbable d'une insertion totale de nos porines dans les liposomes. Il est en effet probable qu'une certaine fraction des porines, et possiblement la majorité, ne s'insère pas dans les liposomes mais plutôt précipite en solution. Plus après, nous décrirons l'utilisation du principe de séparation sur gradient de sucrose pour déterminer expérimentalement la quantité de protéines effectivement insérée dans les protéoliposomes⁹⁸.

I-5: Méthodes d'encapsulation de molécules solubles au sein des liposomes

Les liposomes sont constitués d'une membrane lipidique qui délimite un compartiment interne aqueux. Il sera possible de piéger des molécules hydrophiles dans ce dernier : on parlera alors d'encapsulation. Selon le type de liposomes préparés, différentes méthodes d'encapsulation peuvent être envisagées. Nous en avons utilisé deux que nous

résumons ci après.

Encapsulation dans des LUV préparés par la méthode d'hydratation des films

Cette méthode suppose la réhydratation du film avec un tampon contenant la molécule à encapsuler et résulte en l'obtention des MLV la contenant dans ses couches de solvant. Après plusieurs cycles de congélation et de décongélation, les molécules à encapsuler sont réparties entre l'intérieur et l'extérieur des liposomes selon le rapport des volumes internes et externes à une concentration de lipides donnée, et pour une taille de liposomes donnée⁹⁹. Les molécules non encapsulées sont ensuite éliminées par dialyse. Différents facteurs peuvent favoriser le taux d'encapsulation, notamment l'augmentation du nombre de cycles de congélation et de décongélation. Il a été montré qu'au-delà de 20 cycles on atteint une efficacité d'encapsulation optimale et que 10 cycles d'extrusion sont suffisants pour calibrer les liposomes⁹⁹. La composition du tampon pourra également influencer sur le taux d'encapsulation. Il a été montré, par exemple, que des fortes concentrations en NaCl influent défavorablement sur le taux d'encapsulation⁹⁹.

Encapsulation dans des GUV

L'encapsulation se déroule en ajoutant les molécules d'intérêt à encapsuler directement dans le tampon d'hydratation du film lipidique (§ I.3). Après application du champ électrique et formation des GUV, les composés d'intérêt se trouvent piégés dans le compartiment aqueux du liposome. Les molécules non encapsulées sont ensuite éliminées par dialyses successives¹⁰⁰. Le taux d'encapsulation n'est pas déterminable en considérant que l'electro-swelling est en pratique toujours partiel (*i.e.* tous les lipides ne sont pas impliqués dans la formation des liposomes).

II- Cristallographie aux rayons X

La radiocristallographie est la méthode la plus prolifique pour déterminer la structure des macromolécules biologiques à l'échelle atomique. L'utilisation de rayons X à cet escient se justifie par le fait que les longueurs d'onde des rayonnements X sont du même ordre de grandeur que les distances interatomiques (~1 Å). Cette méthode a permis la détermination des structures tridimensionnelles de plusieurs dizaines de milliers de macromolécules biologiques de taille et de complexité variable. En offrant aux biochimistes une vision fine de l'objet de leur recherche, ces structures ont permis de mieux comprendre le fonctionnement

moléculaire des systèmes vivants. En cristallographie, on exploite la diffusion élastique des rayons X par les électrons constitutifs de la macromolécule biologique cristallisée. Celle-ci renseigne *in fine* sur la densité électronique du système, c'est à dire le nombre d'électrons par unité de volume. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la radiocristallographie monochromatique comme méthode de détermination structurale. Nous présentons ci-après dans une première partie, quelques aspects théoriques, et dans une deuxième partie, quelques aspects pratiques de cette méthode ainsi que les difficultés rencontrées quand elle est appliquée aux protéines membranaires.

II-1: Bases théoriques de la cristallographie monochromatique de protéine

La diffraction des rayons X par les cristaux

En cristallographie on exploite la diffusion élastique des rayons X par les électrons constitutifs de la macromolécule biologique cristallisée. Celle-ci renseigne *in fine* sur la densité électronique du système, c'est à dire le nombre d'électrons par unité de volume. En pratique, c'est parce que l'interaction des rayons X avec la matière est extrêmement faible que l'expérimentateur a recours à un cristal, lequel sert donc d'amplificateur du signal. Un cristal correspond à un empilement périodique de molécules, donc à un réseau. Les ondes diffusées par un réseau interfèrent les unes avec les autres, soit d'une manière constructive, soit de manière destructive. La loi de Bragg permet de prédire les directions discrètes de l'espace dans lesquelles auront lieu les interférences constructives considérant un réseau et une longueur d'onde donnés. En pratique, on aura recours à la transformée de Fourier pour passer de l'espace de la diffraction (espace réciproque) à l'espace de la molécule (ou espace réel). Cette transformée pallie à l'absence de lentilles permettant de refocaliser les rayons X.

La loi de Bragg

Dans une expérience de diffraction monochromatique, le cristal est placé sur le trajet d'un faisceau de rayon X. Dans une installation de type synchrotrons comme l'ESRF, de très hautes brillances et de très petites focalisations peuvent être atteintes (< 50 nm). Un cristal de protéine est un réseau cristallin constitué de plusieurs rangées de protéines nommées plans réticulaires. Chacune des ces familles de plans est séparée par une distance caractéristique d . Si tous les atomes du cristal participent à la diffusion élastique (ou inélastique) des rayons X, la loi de Bragg exprime qu'à une longueur d'onde donnée, des interférences constructives entre ces ondes diffusées n'auront lieu que dans quelques directions discrètes de l'espace

réciroque, celles déterminées par les plans réticulaires (Figure 22 B). Plus la distance entre ces plans est courte et plus le signal diffusé contient une information structurale à haute résolution. Les plans réticulaires séparés par une distance caractéristique courte sont ceux dont les réflexions sont observées à un angle large par rapport à la direction du faisceau incident. On exprime cette condition de diffraction par la loi de Bragg :

$$2d \sin\theta = n\lambda$$

où d correspond à l'espacement entre deux plans parallèles, θ à l'angle de réflexion des rayons X sur ces plans et λ à la longueur d'onde.

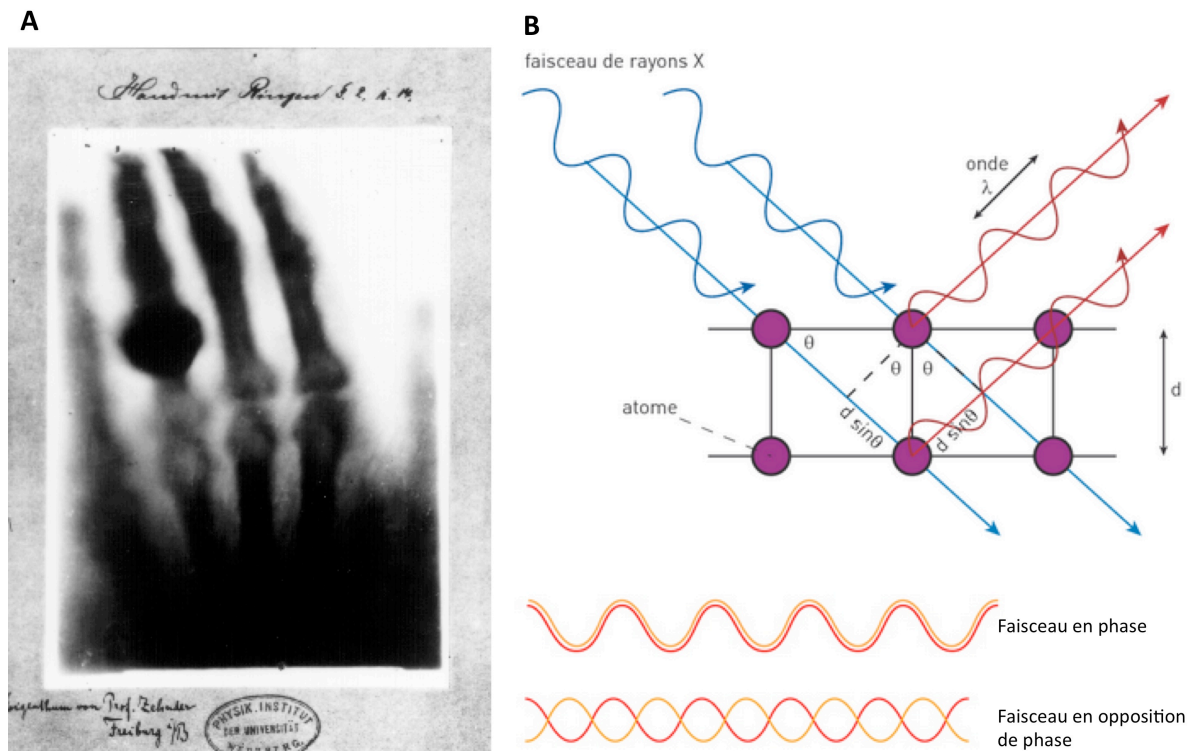


Figure 22: La diffraction aux rayons X. A/ Photographie de la première radiographie de l'histoire prise le 22 décembre 1895 sur la main d'Anna Bertha Röntgen, la femme du découvreur des rayons X (Wilhelm Röntgen) (Figure adaptée de Wikipedia). En radiographie, les rayons X utilisés sont des rayons X mous (de basse énergie: < 5 keV) B/ Représentation schématique de la loi de Bragg et du concept de diffraction.

Lorsqu'un cristal de protéines est exposé aux rayons X, il y a diffraction dans des directions

discrètes de l'espace qui satisfont la loi de Bragg. Les taches observées sur ce cliché correspondent aux faisceaux de rayons X réfléchis par les plans réticulaires du cristal et enregistrés par le détecteur. L'intensité des réflexions à différents points h, k, l correspond à la convolution de la transformée de Fourier continue de la molécule et de celle du réseau cristallin. C'est ainsi que la mesure de ces intensités pourra renseigner sur la position des différents atomes dans la maille. Dans une orientation fixe du cristal dans le faisceau de rayon X pour une longueur d'onde fixe, il n'est pas possible d'extraire une information complète sur la position de tous les atomes dans la maille du cristal. Pour remédier à cette limitation, il est nécessaire de soumettre le cristal à une oscillation durant l'exposition afin d'autoriser le plus possible des plans réticulaires à réfléchir les rayons X.

Le réseau réciproque

La finalité d'une expérience de cristallographie au rayon X est l'obtention d'une structure tridimensionnelle de la macromolécule cristallisée. Pour aboutir à cette fin, il faudra représenter l'expérience dans un nouvel espace qui permettra l'interprétation du cliché de diffraction. Cet espace est connu sous le nom du réseau réciproque. Dans la représentation de la loi de Bragg fournie en figure 22 B, le réseau cristallin appartient à l'espace réel et les ondes à l'espace réciproque. Les vecteurs périodiques reliant les atomes équivalents du cristal sont a, b, c dans l'espace direct. Ils déterminent directement les normes et directions des vecteurs a^*, b^* et c^* reliant des plans équivalents du réseau réciproque. Dans le cas le plus élémentaire, i.e. si les angles α, β et γ de la maille cristalline sont égaux à 90° , ces vecteurs sont reliés par une relation d'inversion simple ($a^* = 1/a$, $b^* = 1/b$ et $c^* = 1/c$). Par conséquent, à chaque nœud du réseau réciproque correspond un plan particulier du réseau direct. Ces nœuds sont identifiés par des indices de Miller (h, k, l) au sein de l'espace réciproque. La dimension d'un vecteur du réseau réciproque est égale à la valeur réciproque de l'espacement entre deux plans parallèles du réseau $1/d_{hkl}$. Le centre du cristal est par conséquent le centre du réseau réciproque.

Les facteurs de structure

Le réseau réciproque (ondes observées sur le cliché de diffraction) est relié au réseau réel (présent dans le cristal) par une relation mathématique : la transformée de Fourier. Les atomes qui constituent la maille élémentaire d'un cristal possèdent des positions fixes les uns par rapport aux autres qui seront conservés au sein du cristal entier par application de la

symétrie cristallographique. On peut maintenant se placer non plus à l'échelle d'un atome mais à l'échelle de la maille élémentaire d'un volume V et introduire les facteurs de structures qui représentent des fonctions de distribution de la densité électronique $\rho(x, y, z)$, à chaque point (x, y, z) de l'espace réel :

$$F_{hkl} = V \int_h \int_k \int_l \rho(x, y, z) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} dx dy dz$$

où ρ est la densité électronique, V le volume de la maille et x, y, z sont les coordonnées fractionnaires de l'espace direct. Il est ainsi possible d'accéder à l'image de la densité électronique par transformée de Fourier inverse :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Chaque facteur de structure F_{hkl} est défini par une amplitude $|F_{hkl}|$ et une phase α_{hkl}

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \cos 2\pi(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})$$

Il est ainsi nécessaire d'avoir accès aux deux informations (amplitude et phase) afin d'obtenir une carte de densité électronique $\rho(x, y, z)$ grâce à laquelle on construira un modèle de la structure d'intérêt. L'amplitude $|F_{hkl}|$ est directement proportionnelle à la racine carrée des intensités mesurées. L'information de phase ne peut être obtenue lors de l'expérience de cristallographie, par conséquent il est nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes afin de résoudre le problème de phases. Deux méthodes seront décrites dans la section II.4.

II-2: Bases pratiques de la cristallographie monochromatique de protéine

II-2.1 : Cristallogénèse des protéines

En pratique, c'est parce que l'interaction des rayons X avec la matière est extrêmement faible que l'expérimentateur a recours à un cristal, lequel sert donc d'amplificateur du signal. Un cristal consiste en une répétition, le long de ses trois dimensions, d'un motif donné que l'on nomme la « maille » (unit cell). Cette maille pourra

contenir une ou plusieurs copies de la molécule d'intérêt. En général ces molécules sont liées les unes aux autres par des opérateurs de symétrie cristallographique. L'unité asymétrique consiste alors en la plus petite portion de la maille permettant la reconstruction entière du cristal en utilisant les opérateurs de symétrie cristallographique. Cette unité pourra également contenir plusieurs copies de la molécule d'intérêt ; on parlera alors de la symétrie non cristallographique.

La méthode de cristallisation des protéines la plus utilisée de nos jours est celle dite de diffusion de vapeur ¹⁰¹ (Figure 23). Cette méthode consiste à déposer, sur une lame de verre, un mélange de la solution protéique et d'un agent précipitant. Cette lame est ensuite disposée dans un milieu hermétiquement clos, où elle fait face à une solution de réservoir contenant le même agent précipitant à une concentration plus élevée. L'équilibration des concentrations est atteinte par évaporation lente de l'eau de la goutte vers le réservoir (diffusion de vapeur). La diminution du volume de la goutte entraîne la concentration de la solution en protéine ainsi qu'en agent précipitant. Ce mélange est ainsi amené à l'état de sursaturation, favorable à la nucléation et la croissance cristalline. Plusieurs types de précipitants existent et peuvent favoriser la nucléation des cristaux. Parmi ces précipitants, le PEG (polyéthylène glycol) présent sous différentes tailles moléculaires agit par compétition stérique avec les molécules d'eau entourant les protéines. Notons que ce précipitant est souvent utilisé à des pH proches du point isoélectrique de la protéine (pKi) où les interactions hydrophobes prédominent. Les sels, quant à eux, agissent sur la force ionique du milieu et favorisent la nucléation par un phénomène nommé le « salting out ». Contrairement au PEG, la cristallisation de la protéine en présence du sel est souvent favorisée à des pH loin de son pKi. La cristallisation d'une macromolécule est toujours incertaine, mais elle l'est d'autant plus que la macromolécule en question peut faire peu de contacts spécifiques avec elle-même. C'est exactement le cas des protéines membranaires, et explique qu'elles ne présentent que 2% des structures présentes dans la PDB (Protein Data Bank).

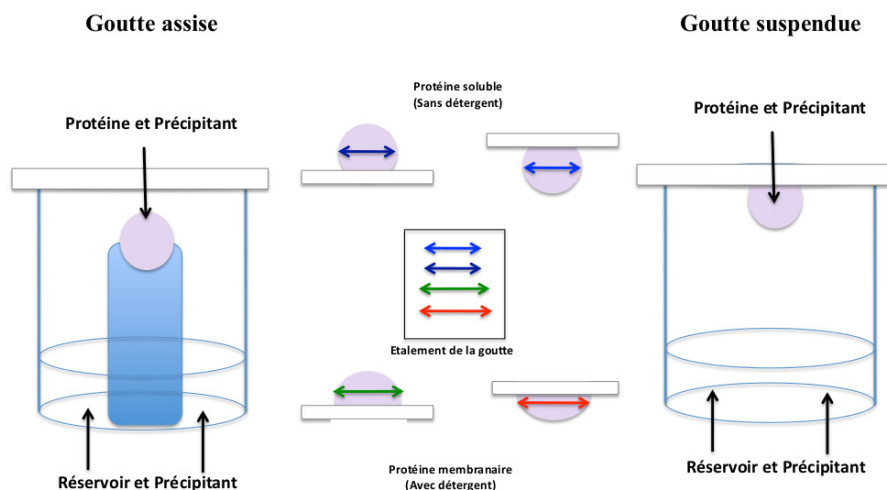


Figure 23: Représentation schématique de la cristallisation par diffusion de vapeur pour les protéines membranaires et solubles. L'étalement de la goutte sur la lame de verre peut varier en présence ou en absence du détergent et si la goutte est suspendue ou assise. Les flèches multicolores représentent le diamètre de l'étalement de la goutte sur la lame. Pour les protéines solubles et en absence du détergent, la goutte est maintenue sur la lame en goutte assise et suspendue, gardant une forme presque sphérique. Pour les protéines membranaires, la présence du détergent diminue la tension de surface entre la goutte et la lame du verre ce qui conduit à son étalement sur la surface. L'étalement est d'autant plus significatif en goutte suspendue qu'en goutte assise.

Difficultés liées à la cristallisation des protéines membranaires

La cristallisation des protéines membranaires exige des manipulations souvent fastidieuses et délicates. Il y a à cela plusieurs raisons : tout d'abord, il est difficile de purifier les protéines membranaires à plus de 95%. Cela est souvent dû à la présence de lipides attachés et co-purifiés avec ces protéines ¹¹. La présence de détergents complique par ailleurs le diagramme de phase des solutions de protéines et de liqueurs mères (Figure 24) ¹⁰². Il est recommandé de travailler à des concentrations en détergent légèrement au dessus de la CMC (limite de consolution) afin de réduire, d'un côté les risques de précipitation de la protéine tout en assurant qu'elle ait tendance à cristalliser et d'un autre côté, la source d'hétérogénéité introduite par l'excès des micelles de détergent. Le principal obstacle à l'obtention des cristaux de protéines membranaires tient au nombre réduit de contacts spécifiques possibles entre différentes zones du cristal. Les contacts cristallins sont en effet médiés par des résidus hydrophiles, le plus souvent chargés, et beaucoup moins souvent (sinon jamais) par des régions hydrophobes (les interactions de van der Waals sont faibles et non spécifiques).

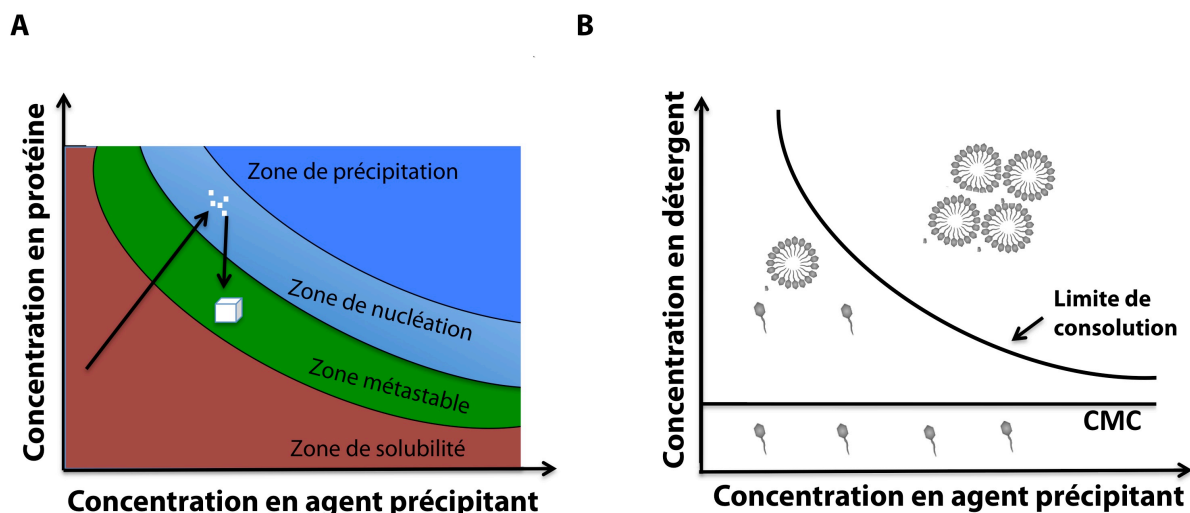


Figure 24: Diagramme de phases. A/ Une représentation schématique du diagramme des phases d'une macromolécule biologique. Lorsqu'on cristallise en goutte suspendue, les deux concentrations en protéine et en agent précipitant augmentent progressivement. La zone de solubilité désigne l'état où la protéine est en solution, aucun cristal n'est obtenu dans ces conditions. La zone de nucléation est la zone où des microcristaux commencent à apparaître et la concentration en protéine diminue en conséquence jusqu'à atteindre la zone métastable dans laquelle des cristaux de taille plus grande se forment. B/ Diagramme de phase d'un détergent non chargé. Les détergents en solution, à des concentrations égales ou légèrement supérieures à sa CMC sont en équilibre dynamique entre deux formes, micellaires et molécules libres. A des concentrations plus élevées, les micelles dominent et s'agencent les unes à côté des autres.

Une difficulté supplémentaire est que les détergents modifient la tension de surface des solutions de protéines, lesquelles auront donc tendance à s'étaler à la surface de la lamelle de verre (Figure 23). Cela résultera en une diffusion de vapeur sous optimale et difficilement reproductible. Cela compliquera par ailleurs le pèchage des cristaux. Enfin, il faut noter que le nombre réduit de contacts cristallins se traduit *in fine* par une augmentation de la quantité de solvant dans le cristal, et donc par des cristaux généralement fragiles.

Autres alternatives à la cristallisation des protéines membranaires

Les détergents ne miment qu'imparfaitement l'environnement natif des protéines membranaires. Ainsi, ils stabilisent celles-ci de façon suboptimale et variable, selon le couple protéine/détergent considéré. Plusieurs méthodes basées sur l'utilisation de mélanges lipide-détergent (les bicelles) ou sur des phases lipidiques pures (la phase lipidique cubique) ont donc été développées en vue de maximiser les chances de réussite en cristallogénèse de protéines membranaires (Figure 25). Les bicelles présentent l'avantage d'une courbure faible de leur membrane qui stabilisera mieux les protéines membranaires insérées dans leur sein ¹⁰³. Elles sont faciles à manipuler, de même que les solutions mélangées de bicelles et de protéines. Les phases lipidiques cubiques présentent l'avantage de n'être constituées que de lipides et de mimer au mieux l'environnement natif de la protéine ¹⁰⁴. Le désavantage majeur

de cette méthode est que les cristaux obtenus sont difficiles à visualiser et à manipuler. Il faudra en pratique dissoudre la phase lipidique avant de les pêcher.

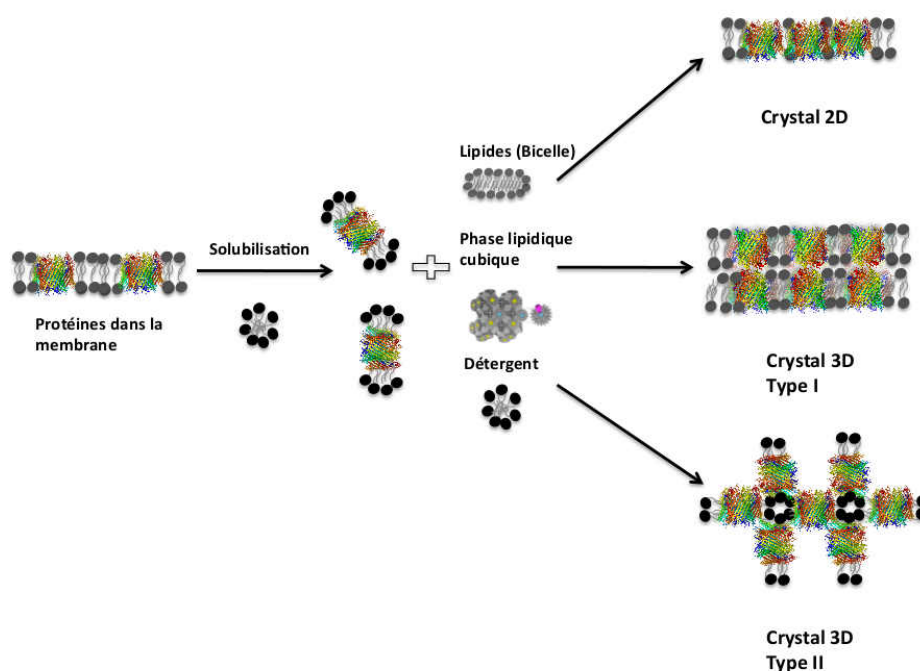


Figure 25: Représentation schématique des trois méthodes de cristallisation de protéines membranaires. De gauche à droite, les protéines membranaires présentes dans leur milieu naturel au sein de la membrane subissent une solubilisation en présence du détergent. Après leur isolation et purification, trois méthodes de cristallisation peuvent être envisagées : la méthode classique en présence du détergent, la méthode bicelle et la méthode de phase lipidique cubique. Selon le choix de la méthode, différents types de cristaux peuvent être générés. Au sein des cristaux 2D, les protéines s'agencent d'une façon périodique dans les deux dimensions de l'espace, contrairement aux cristaux 3D où cet agencement existe également dans une troisième dimension de l'espace. Les cristaux en 3D peuvent se distinguer selon deux types : le type I implique des contacts cristallins au sein des parties hydrophiles et hydrophobes de la protéine, contrairement au type II, où seules les parties hydrophiles sont concernées.

II-2.2: Enregistrement des données de diffraction

Les sources des rayons X

L'enregistrement de données cristallographiques à haute résolution exige une source de rayon X intense et brillante. L'Institut de Biologie Structurale (IBS) est situé à proximité du synchrotron (ESRF) de Grenoble, un instrument qui permet de générer des rayons X de très haute brillance. Cet instrument est composé de trois éléments principaux : i/ un accélérateur linéaire, dans lequel les électrons seront accélérés sous l'action d'un champ électrique haute tension, ii/ un « booster » dans lequel les électrons, en provenance de l'accélérateur linéaire, seront accélérés à une vitesse proche de celle de la lumière, iii/ un anneau de stockage, dans lequel les électrons provenant du booster seront injectés. Suite à l'application d'un champ magnétique perpendiculaire à leur trajectoire, les électrons vont

émettre un faisceau de rayon X qui a pour caractéristiques d'être fin, polarisé et très intense avec un choix spectral large allant jusqu'au-dessous de 1 Å.

Montage des cristaux

Les cristaux de protéines membranaires possèdent un très large pourcentage de solvant et sont par conséquent fragiles à manipuler et sensibles aux dommages d'irradiation. Afin de pouvoir collecter des données de diffraction interprétables sur ces cristaux, il faudra réduire les effets d'endommagement de ces cristaux par les rayons X. C'est la raison pour laquelle la collecte des données est souvent réalisée à température cryogénique sous un flux d'azote gazeux à 100 K, aligné sur la position du cristal. Parfois le cristal est congelé au moment de sa mise en place sur le goniomètre quand d'autre fois, il est congelé dans l'azote liquide avant d'être transféré (manuellement ou robotiquement) dans le flux d'azote gazeux. Dans les deux cas, la congélation est extrêmement rapide et on parle du « flash cooling ». Pour éviter la formation de glace qui détruirait le cristal et donc la diffraction, les cristaux sont préalablement trempés dans une solution cryoprotectrice. La présence du cryoprotectant est critique, notamment dans le cas des protéines membranaires qui présentent un pourcentage de solvant souvent supérieur à 60%. La présence des cryoprotectants va empêcher la cristallisation de l'eau, qui sera piégée dans une phase amorphe à basse température. En pratique, on transfère le cristal à l'aide d'une cryoboucle en nylon dans la solution cryoprotectrice pendant 1 à 30 secondes avant de monter cette boucle sur le goniomètre aligné avec le flux d'azote à 100 K. Après montage du cristal sur le goniomètre, celui-ci est aligné avec le flux de rayons X. L'expérience de diffraction inclue également l'optimisation des paramètres de collecte de données, notamment la distance cristal-détecteur, le centrage du cristal, la transmission et le temps d'exposition du cristal aux rayons X.

Collecte des données cristallographiques

Pour collecter des données cristallographiques sur un cristal de protéine, il faudra pouvoir détecter les rayonnements diffractés et mesurer leurs intensités. Les détecteurs les plus fréquemment utilisés au synchrotron sont les détecteurs CCD (Charge Coupled Device) grâce à leur temps de lecture très rapide. L'excitation des électrons du silicium de chaque pixel du CCD par des photons X génère une charge qui sera amplifiée et convertie en signal électrique. Ce type de détecteur est très sensible et possède une statistique de comptage très élevée, qui autorise des temps d'acquisition de 0.2 à 1 s par image. Ces détecteurs fournissent des clichés de diffraction comme celui présenté en figure 26. Les taches observées sur ce

cliché correspondent aux intersections entre le faisceau de rayon X réfléchis par les plans réticulaires du cristal et le détecteur.

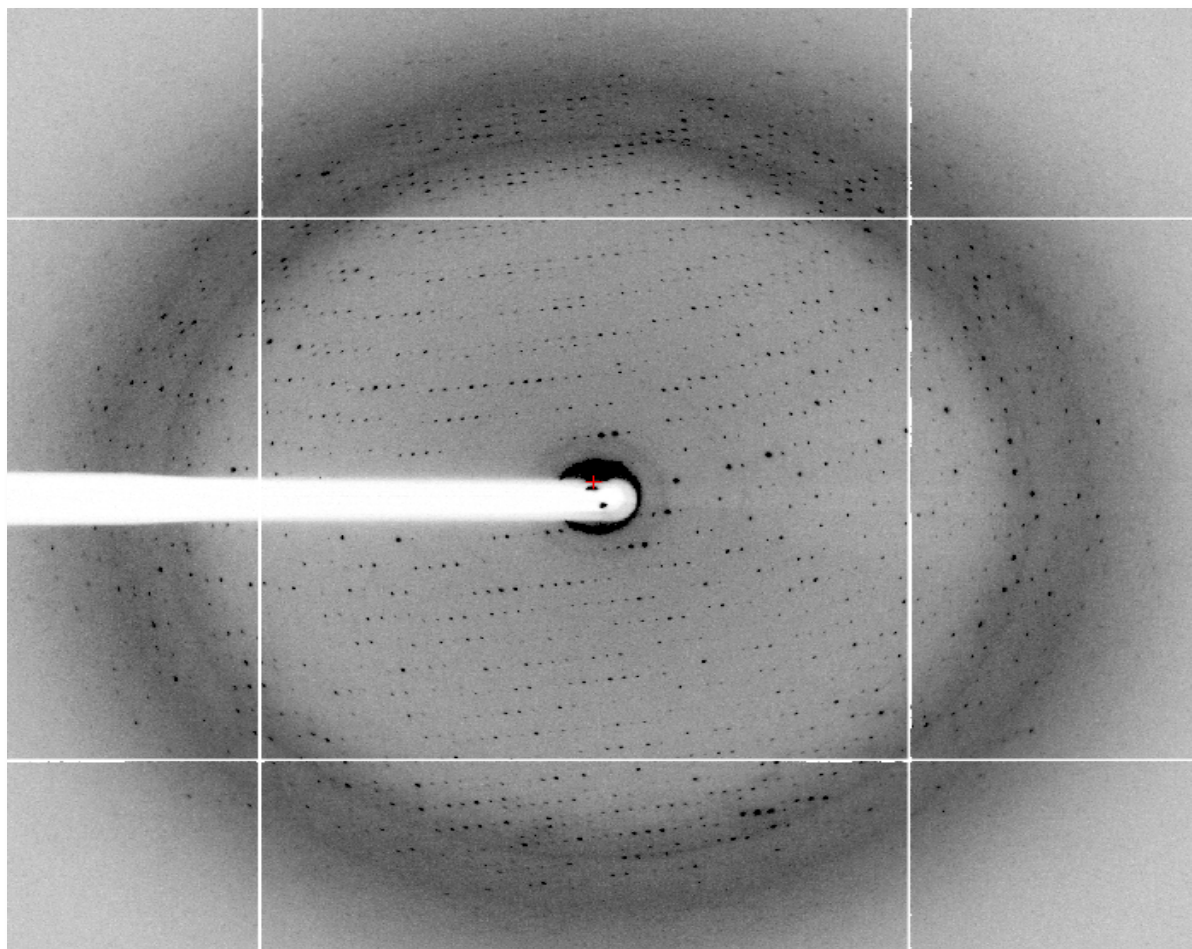


Figure 26: Cliché de diffraction collecté sur un cristal de porine Omp-Pst1-ATCC à l'ESRF.

Pour enregistrer un jeu de données complet sur un cristal, il faut enregistrer la diffraction par chacun des plans réticulaires uniques du cristal au moins une fois. Pour une longueur d'onde et une orientation donnée, il n'y aura mise en condition de diffraction que de certains plans réticulaires du cristal. Pour obtenir un jeu de données complet, on soumettra le cristal à une rotation et enregistrera des données d'oscillation. Chaque image correspond alors à 0.1 à 5° d'oscillation selon la taille de la maille et la stratégie de collecte des données. Selon la symétrie interne du cristal, il faudra collecter des données sur une plage angulaire plus ou moins large.

II-2.3: Traitement des données de diffraction

De nos jours, le traitement de données cristallographiques est essentiellement

informatique. Il reste cependant utile de savoir ce que l'ordinateur fait et nous explicitons donc, dans les paragraphes qui suivent, les différentes étapes de ce traitement.

La première étape du traitement de données sera l'indexation de l'ensemble des taches collectées. Cette étape consiste à déterminer l'orientation du cristal et ses paramètres de maille, grâce à la position des taches de diffraction sur quelques images. On assigne à chaque réflexion un point du réseau réciproque d'indices h, k, l (indices de Miller). Quelques images de diffraction suffisent pour proposer les groupes d'espace possibles, et à chacun d'entre eux, une pénalité est associée. En pratique, le choix se porte sur le groupe d'espace ayant la plus faible pénalité et la plus haute symétrie. Suite à l'indexation des images de diffraction, on vérifiera et affinera les paramètres géométriques de la collecte, notamment la distance cristal-détecteur, la position du faisceau incident, l'orientation du cristal par rapport au faisceau.

La deuxième étape consistera à déterminer l'intensité des taches de diffraction, on parle d'intégration. Ceci nécessite de bien discerner les pixels à intégrer de ceux n'ayant enregistré que du bruit. Les logiciels de traitement prennent en considération différents paramètres lors de cette étape pour avoir le meilleur profil des intensités normalisées avec le meilleur rapport signal/bruit. Les effets d'absorption, de polarisation et de divergence du faisceau incident sont également non négligeables et sont pris en compte.

La troisième étape sera la réduction et la mise à l'échelle des données. Les intensités des réflexions liées par la symétrie devraient être identiques, dans le cas idéal. Malheureusement, plusieurs contraintes expérimentales traduisent des variations entre ces mesures, notamment l'endommagement des cristaux par le flux de rayons X, l'hétérogénéité de forme d'un cristal, etc. Pour tenir compte de tous ces paramètres, il faut donc mettre au même niveau d'intensité ces différentes réflexions. Ceci va générer, après la réduction, une série de réflexions uniques, nécessaires pour calculer l'image de la densité électronique par transformée de Fourier. On obtient ensuite les intensités moyennes de ces taches pondérées par la déviation standard de la mesure. Les intensités mesurées sont proportionnelles au carré de l'amplitude des facteurs de structures.

Evaluation de la qualité d'un jeu de données cristallographique

La qualité d'un jeu de données est déterminée par différents critères statistiques, calculés au cours du traitement. Les paramètres les plus significatifs sont : Le rapport signal

sur bruit, la complétude, la redondance, le facteur R_{merge} , le facteur B de Wilson et la résolution.

- **Le rapport signal sur bruit ($I/\sigma I$):** Cette valeur, qui est le rapport entre l'intensité mesurée et l'écart type sur cette mesure, permet d'estimer la vraisemblance de la mesure. Le rapport signal sur bruit ($I/\sigma I$) des réflexions est dépendant du bruit de fond et de l'erreur expérimentale. Plus ce ratio est élevé, plus les données sont de bonne qualité.

- **La complétude:** Cette mesure correspond au pourcentage de réflexions mesurées par rapport au nombre total de taches mesurables pour obtenir un jeu de données complet à une résolution donnée. À partir de 90%, on pourra considérer le jeu de données comme suffisamment complet, mais l'expérimentateur vise évidemment 100%.

- **La redondance:** Cette mesure correspond au nombre de fois que les réflexions liées par la symétrie sont mesurées. Plus sa valeur est grande, meilleure sera l'estimation de l'intensité réelle d'une réflexion unique.

- **Le facteur R_{merge} :** Cette mesure correspond à la déviation entre l'intensité de réflexion symétriquement équivalente à la valeur moyenne de leur intensité.

$$R_{merge} = \frac{\sum_{h'k'l'} \sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I_{h'k'l'} \rangle|}{\sum_{hkl} I_{hkl}}$$

où I_{hkl} est l'intensité mesurée de la réflexion hkl et $\langle I_{h'k'l'} \rangle$ est l'intensité moyenne de la réflexion unique $h'k'l'$.

- **Le facteur B de Wilson:** Ce facteur reflète le désordre statique et dynamique du cristal. Le désordre est déclenché par différents facteurs, comme par exemple l'agitation thermique, le pourcentage du solvant au sein du cristal, les zones flexibles et agitées des protéines.

- **La résolution** : Cette grandeur indique le degré de détail qu'on est capable de discerner dans la densité électronique. Plus la résolution est élevée, plus on peut voir de détails fins dans la structure. Par exemple, un jeu de données de résolution inférieure à 2.5 Å ne permet de définir que la position de groupes d'atomes dans la carte de densité électronique, alors qu'à plus haute résolution, on sera capable de définir la position individuelle de chaque atome, voire celle des atomes d'hydrogène pour des données à des résolutions meilleures qu'1 Å.

II-2.4: Phasage de la structure

Les rayons X, comme toutes les ondes électromagnétiques possèdent une amplitude et une phase. Il sera nécessaire d'avoir accès aux deux informations (amplitude et phase) afin d'obtenir une représentation tridimensionnelle des atomes des molécules qui composent un cristal. Contrairement à l'amplitude, l'information sur la phase ne peut être obtenue lors de l'expérience de cristallographie. Par conséquent, il sera nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes afin de récupérer cette information. Différentes méthodes existent qui permettront de phaser un jeu de données autorisant ainsi la résolution de la structure. Certaines, comme le remplacement isomorphe et la diffusion anormale, permettent de récupérer l'information des phases expérimentalement. Ils prennent avantage de la complexation du cristal de protéine avec des atomes lourds, dont le pouvoir diffusif, proportionnel au nombre d'électrons, sera très élevé. D'autre, comme le remplacement moléculaire, se base sur l'homologie structurale où la structure d'une protéine homologue servira pour phaser, approximativement, le jeu de données de la protéine d'intérêt. Il existe également des méthodes de phasages dites directes qui permettent de tirer des informations sur les phases à partir des intensités mesurées. Parmi ces différentes techniques, deux ont été employées au cours de cette thèse: la méthode de remplacement moléculaire et les méthodes directes.

La méthode de remplacement moléculaire

Lors d'un phasage par remplacement moléculaire, un modèle atomique préexistant est utilisé pour générer un jeu de phases initiales. En pratique, une molécule modèle, qui possède une identité de séquence d'au moins 25% avec la structure étudiée, sera placée virtuellement dans l'unité asymétrique du cristal étudié afin de pouvoir obtenir une première estimation des phases des facteurs de structure. Le problème consiste à trouver la matrice de rotation (R) et le vecteur de translation (T) permettant de simuler le plus précisément possible le contenu de la maille étudiée. La recherche des fonctions de rotation et de translation se fait grâce à des fonctions de corrélation permettant de comparer les amplitudes mesurées lors

d'une expérience de diffraction à celles calculées à partir du modèle. Dans un remplacement moléculaire, ce sont les cartes de Patterson du jeu de données et celles calculée à partir du modèle qui sont comparées. Une carte de Patterson est une auto convolution du jeu de données par lui même. Elle est une carte des distances interatomiques dans l'unité asymétrique du cristal. La méthode de remplacement moléculaire tire avantage de l'augmentation du nombre des structures de protéines résolues et déposées dans la Protein Data Bank. Cela augmente par conséquent la probabilité de trouver un modèle structuralement proche de la protéine d'intérêt. Dans le cadre de notre thèse, nous avons utilisé le programme PHASER pour effectuer le remplacement moléculaire ¹⁰⁵.

Les méthodes directes

Ces méthodes permettent de résoudre le problème de phase par calcul. Elles ne nécessitent que les intensités des facteurs de structure mais ne sont applicable qu'à très haute résolution ($\sim 1\text{\AA}$) et pour des cristaux de molécules relativement petites (jusqu'à 1000 atomes). Utilisant une théorie probabiliste complexe, ces méthodes sont basées sur l'existence de relations mathématiques entre certaines combinaisons de phases. À partir de ces relations, un nombre suffisant d'estimations de phases initiales peut être obtenu pour générer un jeu complet de phases. Au cours de cette étude, nous avons utilisé la suite logicielle SHELX ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ pour résoudre la structure cristallographique de peptides dont la taille n'excédait pas 100 atomes. Pour les structures contenant plus de 1000 atomes, d'autres méthodes ont été développées, notamment la méthode "Shake-and-Bake" ¹⁰⁹ qui utilise à la fois l'espace réel et l'espace réciproque au cours de l'affinement des phases. Cette méthode débute par la génération d'un arrangement aléatoire d'atomes qui permet de générer des phases initiales. Celles-ci entrent ensuite dans un processus itératif qui consiste à affiner ces phases dans l'espace réciproque (procédure de "shaking") puis dans l'espace direct (procédure de "baking"). Ces méthodes tirent avantage de la puissance de calcul des ordinateurs.

II-2.5: Affinement de la structure et construction du modèle

Une fois le problème de phase résolu, on dispose d'une carte de densité électronique interprétable dans laquelle le modèle initial de la protéine cristallisée sera construit. Les facteurs de structure calculés à partir du modèle initial n'étant que partiellement en accord avec les facteurs de structure observés, l'affinement du modèle atomique aura pour but de faire converger le modèle de départ vers la structure inconnue, tout en s'affranchissant du

biais introduit de la structure de départ. Pour ce faire, des cartes de densité électronique sont calculées en utilisant la transformée de Fourier à partir des amplitudes de facteur de structures observées et calculées et des phases de structures calculés. Plusieurs types de carte de densité électroniques existent, dont deux sont le plus souvent employées : la carte $2F_{obs}-F_{calc}$ et la carte de différence $F_{obs}-F_{calc}$. La première permet de générer une densité autour de tout le modèle ; elle rend compte des données expérimentales mais restent fortement biaisée par le modèle. Contrairement à la deuxième qui rend compte de la dissemblance entre le modèle et les données expérimentales. Des pics négatifs sont observés dans les zones où les électrons sont en excès et renseignent sur des atomes qui ne devraient pas être dans le modèle alors que les pics positifs renseignent aux endroits où il faudrait modéliser de nouveaux atomes. Le processus d'affinement devrait ainsi et selon plusieurs cycles répétés itérativement limiter voir éliminer complètement les densités observées dans les cartes de différences. En pratique, selon le nombre d'amplitudes de facteurs de structure uniques enregistrées et le nombre d'atomes dans notre protéine, il faut faire un choix sur les paramètres à affiner. Plus les données sont à haute résolution et la complétude est élevée, plus le nombre de paramètres à affiner sera élevé. Pour évaluer la qualité de l'affinement et par conséquent le modèle final, des facteurs d'évaluation sont introduits :

-Le facteur R ou R_{fact} : Le facteur R permet de suivre la convergence de l'affinement. Il est cependant biaisé par le modèle de départ et le nombre de paramètres affinés.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

- Le facteur R_{libre} ou R_{free} : Le facteur R_{free} permet de suivre la convergence de l'affinement en s'affranchissant du biais introduit par la structure de départ, du sur affinement possible de la structure et du nombre d'atomes contenus dans cette structure. En pratique, ce facteur R_{free} est calculé à partir d'un set de réflexions qui n'est pas utilisé pour l'affinement de 5 à 10% en général. Par conséquent, ce facteur est fortement corrélé à la précision des phases, et permet de détecter de multiples types d'erreurs dans la structure lors de l'affinement. Ainsi l'augmentation du R_{libre} et la diminution du R_{fact} au cours de l'affinement sont la preuve d'un sur-affinement. D'une façon générale, plus le rapport entre le nombre d'observations et le nombre de paramètres à affiner est faible, plus l'écart entre les R_{fact} et R_{free} est élevé.

Les deux programmes d'affinement principalement utilisés au cours de cette étude ont été PHENIX¹¹⁰ et REFMAC5¹¹¹.

II-2.6: Validation du modèle

Il existe plusieurs critères d'évaluation qui permettent de juger de la qualité d'un modèle avant de le déposer dans la PDB. Ces critères sont dépendants de la résolution à laquelle la structure a été affinée. Le facteur R_{fact} et le facteur R_{free} permettent d'évaluer la qualité de l'affinement et du modèle. Ces valeurs sont généralement aux alentours des 10% à une résolution 1 Å et de 20% à une résolution 2 Å, etc. D'autres critères basés sur la qualité stéréochimique du modèle permettent également d'évaluer la vraisemblance de l'affinement. Les déviations moyennes (ou rmsd) sur la longueur de liaisons covalentes en font partie et ne doivent pas dépasser 0.03 Å. La distribution des angles (Φ , ψ) dans le diagramme de Ramachandran permet également de situer le degré d'affinement de la structure. Ce diagramme comporte trois zones énergétiquement favorables pour classer les acides aminés dont deux principales concernent les hélices α , les feuillets β et une dernière correspondant à une conformation en hélice gauche. Cette restriction des conformations, favorisée énergétiquement, est due à l'encombrement stérique imposé par les chaînes latérales des résidus d'acides aminés.

Matériels et Méthodes

I- Biochimie des protéines membranaires

La cristallographie aux rayons X nécessite une grande quantité de protéine pure, typiquement entre 50 et 300 μl à 2-20 mg/ml pour les premiers essais de cristallisation. Il est donc nécessaire d'optimiser la production et la purification avant de se lancer dans la cristallisation. Dans cette partie, nous allons décrire comment nous avons résolu ces différents problèmes.

I-1: Transformation et expression des porines

Préparation du système d'expression à la transformation

Le système d'expression que nous avons choisi pour exprimer nos porines est la souche *E. coli* Δomp8 , qui correspond à la souche BL21(DE3) déletée pour ses porines non spécifiques (OmpF, OmpC) et LamB ¹¹². Cette souche est évidemment moins performante et plus sujette aux mutations que la souche BL21 (DE3). Pour la sélectionner, une cassette de résistance à la kanamycine a été insérée dans son génome. Nous avons ensemencé une colonie de cette souche dans une mini culture d'un milieu LB (Luria-Bertani) de 5 mL, puis incubé à 37 °C pendant la nuit sous agitation à 225 rotations par minute (rpm). Le lendemain, 200 ml d'un nouveau milieu LB ont été ensemencés avec 2 ml de la mini culture puis incubés à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique du milieu à 600 nm ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$) atteignent une valeur comprise entre 0.5 et 1. Pour transformer les cellules nous avons eu recours à l'électroporation (voir plus bas). A dessein, nous avons éliminé le sel présent dans le milieu. Ceci a été permis par des cycles de lavages à l'eau distillée et de centrifugation à 3000 rpm à 4 °C, à la suite de la dernière centrifugation, les cellules furent reprises dans une solution contenant 10% glycérol. Celles-ci furent ensuite conservées à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Préparation du vecteur d'expression à la transformation

Pour nos transformations, nous avons utilisé une variante du vecteur pGompF décrit par Prolipov en 1998 ¹¹². Celui ci nous a été fourni par le prof. Mathias Winterhalter de l'université Jacobs de Brèmes. Ce vecteur contient un promoteur du phage T7, le gène de la porine d'intérêt et une cassette de résistance à l'ampicilline. Pour chaque porines, nous avons généré un vecteur spécifique contenant le gène d'Omp-Pst1 (ATCC, Nea16, 99645) ou d'Omp-Pst2. Ces plasmides recombinants furent amplifiés dans des souches DH5 α d'*E. coli* optimisées pour le clonage. En pratique, 50 ng de plasmides furent ajoutés à 40 μl de cellules,

puis transformés par choc thermique (incubation de 30 min du mélange sur la glace avant un transfert à 42 °C pour 45 s et retour sur glace pour 2 min). Après cette transformation, 250 µl d'un milieu de culture enrichi (SOC) sont ajoutés au mélange, puis le tout est mis sous agitation à 37 °C pendant 1 h. Deux cent microlitres de cette mini-culture sont ensuite transférées dans 200 ml de milieu frais, et mis à incuber à 37 °C sous agitation et en présence d'ampicilline (afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide). Les souches DH5α vont permettre l'amplification des plasmides directement au sein de la bactérie, en suite de quoi cet ADN plasmique sera extrait et purifié à l'aide d'un kit mini/midi prep (Promega).

Transformation par électroporation

L'expression de nos porines réclame de les avoir préalablement transformé avec l'ADN plasmidique adéquat. Nous les transformerons par électroporation en utilisant les plasmides purifiés résultant de l'amplification par DH5α. Pour l'électroporation, 50 ng du plasmide contenant l'insert d'intérêt sont ajoutés à 40 µl de cellules et placés sur glace pendant 1 min. Le mélange est ensuite placé dans une cuve d'électroporation et un choc de 1.8 kV est alors appliqué. Cette tension induit la déstabilisation de la membrane et résulte de la formation de trous dans cette dernière. Les cellules sont alors rendues compétentes et les plasmides pourront pénétrer en leur sein. En pratique on ajoute, après l'application du choc électrique, 200 µl d'un milieu de culture enrichi pour favoriser la régénération des cellules. L'ensemble est incubé une heure à 37 °C sous agitation. On procède enfin à un étalement sur LB agar complémenté par 25 à 100 µg/ml en kanamycine et ampicilline, respectivement. Seules les cellules *Δomp8* ayant intégré le plasmide pourront pousser sur ces boîtes.

Expression des porines

Sur nos boîtes de pétri, nous sélectionnerons une colonie que nous transférerons dans 10 ml de milieu LB complémenté en ampicilline et kanamycine (100 et 25 µg/ml), respectivement et les incubons à 37 °C sous agitation durant la nuit. Le lendemain, 3 L de milieu LB frais sontensemencés à partir de la pré-culture de 10 ml (~ 3ml/ flasque de 1 L). Ces nouvelles cultures sont arrêtées lorsque leur DO₆₀₀ nm atteint une valeur située entre 1.5 et 2. Les bactéries sont alors culotées par centrifugation à 10 000 g et à 4 °C pendant 25 min, puis stockées à -80 °C en attendant la purification. Il faut noter ici qu'aucune induction de l'expression de nos porines n'est requise. En effet, l'avantage sélectif conféré aux bactéries *Δomp8* par la présence de nos porines est tel que l'expression a lieu sous impulsion des

bactéries elles mêmes.

I-2: Extraction et solubilisation des porines à partir des membranes

Les culots bactériens contenant nos porines d'intérêts exprimées dans leur membrane externe sont décongelées sur glace, puis resuspendues dans un tampon phosphate (20 mM ; pH 4). On ajoute également une tablette contenant un cocktail d'anti-protéases et de Dnase (Roche) puis les cellules sont lysées à très haute pression grâce à microfluidiseur (1400 Psi ou 96.6 bar). La lyse des cellules sur microfluidiser réclame plusieurs passage (au moins trois fois). Les cellules non cassées sont ensuite éliminées par centrifugation à 6000 rpm et 4 °C pendant 15 min. Le surnageant, qui contient les fragments de membranes et donc nos protéines d'intérêt, est lui aussi soumis à une centrifugation, et après 20 min à 35 000 rpm et 4 °C, ces membranes sont isolées. Pour extraire les porines de la membrane externe, nous procédons en 2 étapes :

i/ Le culot contenant les membranes est resuspendu dans du tampon phosphate à pH 7.4 en présence de 0.3% de n-Octyl-poly-oxyethylene (Octyl-POE), pendant 1 heure à 37 °C et sous agitation. Dans ces conditions, la membrane interne se solubilise et ses constituants passent dans le surnageant. Cette étape est répétée au moins trois fois. Une étape de centrifugation de 20 min à 35 000 rpm et à 4 °C est réalisée entre chaque resolubilisation. L'élimination des constituants de la membrane interne, et la purification des membranes externes sont ainsi de plus en plus stringentes.

ii/ Le dernier culot de membrane obtenu au cours de l'étape (i) contient toutes les membranes externes et donc toutes nos porines pour les en extraire, nous répétons la séquence (i) mais en utilisant 3% d'Octyl-POE. Les protéines de la membrane externe sont progressivement solubilisées et se retrouvent dans le surnageant.

I-3: Purification des porines

Le surnageant de solubilisation contenant les porines d'intérêt est chargé sur une colonne échangeuse d'anions (HQ HiTrap, 5 ml) préalablement équilibrée avec 3 volumes de tampon d'équilibration (OPOE 2 %, 50 mM tampon phosphate pH 7.4). Après fixation de la protéine, l'OctylPOE est échangé sur colonne en passant un tampon de substitution contenant du LDAO (0.1 M MES à pH 6.5; 0.12 % du N, N-Dimethyldodecylamine N-oxide (LDAO)).

L'échange de détergent peut être une étape critique pour la cristallisation des porines. Après l'échange, une étape supplémentaire de delipidation est réalisée en passant un tampon 17 fois plus concentré en LDAO à un débit de 0.2 ml/min et pendant 4 heures. Cette étape permet d'éliminer les lipides attachés à la porine et d'améliorer l'homogénéité de la préparation. Une dernière étape d'équilibration est réalisée avec le tampon de substitution puis la protéine est éluée grâce à un gradient de NaCl (débit 1ml/min, élution aux alentours de 350 mM). La porine d'intérêt est par la suite concentrée sur Amicon Ultra 50 kDa (Millipore corporation), et sa concentration finale ajustée à 6.7 mg/mL avec une concentration finale de NaCl de 150 mM.

I-4: Coloration nitrate d'argent

Le gel nitrate d'argent est un gel SDS-polyacrylamide 15 %, renfermant les mêmes composants d'un gel d'électrophorèse ordinaire (acrylamide 30 %, SDS 10 %, Tris 1.5 M, TEMED, PSA). Il permet la révélation des lipides LPS et des protéines par un colorant très sensible: le nitrate d'argent. En effet, 10 µl de 5 échantillons: OmpPst2-ATCC, OmpPst1-ATCC, OmpPst1-99645 et OmpPst1-Nea16, contenant chacun 4 µg de protéines, sont mélangés avec 5µl de tampon bleu. En outre, trois échantillons de 0.5, 1 et 1.5 µg de LPS sont utilisés comme référence de taux lipidique et sont mélangés aussi avec 5 µl de tampon bleu. Ces échantillons sont chauffés à 95 °C pendant une minute pour rompre les faibles liaisons hydrogènes intermoléculaires. Ensuite, ils sont soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 200 V de tension et jusqu'à ce que le front du colorant ait migré presque la totalité du gel. Ce gel est après coloré en appliquant les étapes suivantes: i/ Fixation des protéines sur le gel par une solution d'acide acétique 10 % et d'éthanol 30 % pendant 1h d'agitation, ii/ lavage 3 fois du gel avec de l'éthanol 25 % (15 min chacun), iii/ lavage 2 fois avec de l'eau (10min chacun), iv/ Sensibilisation du gel pour 2 min par le thiosulfate de sodium 2.5 mM, v/ lavage 2 fois avec de l'eau (5 min chacun), vi/ coloration pendant 30 min à l'obscurité par une solution de 100 ml contenant 0.2 g d'AgNO₃, 80 µl du formaldéhyde 37 % (l'AgNO₃ est photosensible), vii/ lavage 2 fois avec de l'eau (1 min chacun), viii/ révélation avec une solution de carbonate de sodium 30 mg/ml, thiosulfate de sodium 0.02 mM et formaldéhyde 0,0185 %, ix/ Arrêt de la coloration par ajout de l'acide acétique 100 %.

II-Cristallographie aux rayons X

II-1: Cristallogénèse

Cristallisation des porines en présence du détergent

Le criblage des conditions de cristallisation est effectué par un robot, au laboratoire HTX de l'EMBL. On utilise à dessein des boîtes *Greiner* de 96 puits. La cristallisation est déclenchée par diffusion de vapeur, dans une configuration en goutte suspendue. Les criblages sont réalisés en utilisant les kits commerciaux provenant de chez Hampton ou Quiagen. Les boîtes sont ensuite conservées en chambre froide, à 4 °C, et c'est un autre robot qui, régulièrement, prendra des photos de chacune des gouttes afin de permettre le suivi de leurs historiques. Après détermination des conditions de cristallisation initiales, celles-ci sont affinées par un criblage manuel. Pour ce faire, on utilisera des boîtes plus larges, prévues pour des volumes plus gros (24 puits). On explorera alors l'influence de différents paramètres parmi lesquels la concentration en agents précipitant, en tampon ou en sels, la nature de l'agent précipitant, le pH, la présence d'additifs, etc. En pratique, nous avons filtré tous nos tampons et solutions pour la cristallisation. Les conditions de cristallisation des différentes porines sont :

- Omp-Pst1-ATCC (A): 14% PEG 6000, 0.1 M $MgCl_2$, 0.1 M MES pH 6.5
- Omp-Pst1-ATCC (B): 14% PEG 6000, 0.1 M $MgCl_2$, 0.1 M MES pH 6.5, 10 mM vancomycin
- Omp-Pst1-ATCC-maltose: 14% PEG 6000, 0.1 M $MgCl_2$, 0.1 M MES pH 6.5, 25% maltose
- Omp-Pst2-ATCC: 8% PEG 6000, 0.1 M Tris pH 8, 1 M LiCl
- Omp-Pst1-99645: 14% PEG 6000, 0.1 M $MgCl_2$, 0.1M MES pH 6.5, 0.1 M ampicilline
- Omp-Pst1-Nea16: 14% PEG 6000, 0.1 M $MgCl_2$, 0.1M MES pH 6.5, 5% sucrose

Cristallisation des porines en présence de bicelles

Nous avons tenté de cristalliser nos porines en présence de bicelles¹⁰³. Pour préparer celles-ci, nous avons utilisé la méthode suivante :

i/ On prépare un mélange lipide détergent à un ratio 2.9/1 dans l'eau (mélange de 0.263 g DMPC et 0.087 CHAPSO dans 1 ml de l'eau).

ii/ La préparation des bicelles se fait en plusieurs cycles de trois étapes (bain marie à 50

°C, transfert sur glace, puis centrifugation à 14 000 rpm). On répète ces cycles jusqu'à l'obtention d'une solution claire et homogène. La protéine concentrée est alors mélangée avec la solution de bicelles selon différents rapports de volumes. Une incubation de 30 min sur glace permet à la protéine d'intégrer les bicelles. Le mélange bicelles/protéine doit être maintenu à 4 °C pour rester en phase liquide, jusqu'à mélange avec la solution de liqueur mère, après quoi les gouttes peuvent être maintenues à 20 °C. C'est ce mélange protéines/bicelles qui sera soumis à des essais de cristallisation. Comme décrit précédemment, on commencera par un criblage robotique qu'on optimisera ensuite manuellement. Dans notre cas, nous avons pu obtenir des cristaux à 8% bicelles, 14% PEG 6000, 0.1 M MES pH 6.5, 0.1 M MgCl₂ et à 4 °C. Les cristaux n'ont cependant pas permis la détermination d'une structure.

Cristallisation des porines en phases cubiques lipidiques (LCP)

Quoique nous n'ayons pas pu obtenir des cristaux de bonnes qualités par cette méthode, nous avons également tenté de cristalliser nos porines dans une phase lipidique cubique. Les phases lipidiques cubiques se forment lorsque la concentration en lipides dans l'eau atteint approximativement 60%. On utilise le plus souvent la monooleïne, du fait de la taille adaptée de ses chaînes aliphatiques pour mimer une membrane biologique (18 carbones) et de celle, réduite, de sa position hydrophile (glycérol). A température ambiante, la monooleïne pure est un solide, qu'il faudra chauffer à 42 °C pour le liquéfier et la pipeter. On utilisera alors deux seringues Hamilton de 100 µl chacune, contenant l'une 60 µl de monooleïne pure et l'autre, 40 µl de la solution de protéines. Les deux seringues seront connectés l'une à l'autre grâce à un émulsionner, et différents allez retour du mélange à travers ce dernier permettront l'obtention de la phase lipidique cubique contenant la protéine. Celle ci sera alors translucide et homogène. Cette phase cubique sera laissée à reposer pendant une nuit à 22 °C, après quoi il sera procédé à un criblage des conditions de cristallisation. On utilisera à dessein des plaques de verre contenant 96 compartiments avant que soit ajouté 1 µl de telle ou telle solution de criblage. Les plaques ainsi préparées sont ensuite recouvertes d'un film en plastique et incubées à 22 °C.

Cristallisation des peptides LGNY et GVVTS

Concernant les peptides LGNY et GVVTS, ils ont été cristallisés suivant la même stratégie de criblage puis d'optimisation que celle décrite pour les porines. La reproduction manuelle des cristaux a ensuite été réalisée à 20 °C par diffusion de vapeur en goutte

suspendue dans des boîtes de 24 puits. Les conditions de cristallisation des peptides sont les suivantes :

- LGNY : 3.2 M ammonium sulfate, 0.1 M acide citrique pH 4
- GVVTSSE : 2.5 M ammonium sulfate, 0.1 M acide citrique pH 4

II-2: Procédures de trempage et co-cristallisation

Pour nos trempages, des cristaux natifs d'Omp-Pst1 furent transférés dans des solutions de liqueur mère contenant l'un ou l'autre des différents ligands d'intérêt dans cette étude, notamment des sucres (lactose, maltose, tréhalose, glucose) et des antibiotiques (imipénème, ertapénème, céfepime, céfoxitime, rifampicine, vancomycine, streptomycine, ampicilline et kanamycin). Pour chacun, nous avons testé une large gamme de concentration s'étalant entre 1 et 100 mM (selon la solubilité du composé). Les durées de trempage étaient de deux heures au maximum, après quoi les cristaux étaient transférés pendant 10 à 30 secondes dans des solutions de cryo-protection (liqueur mère + 18% glycérol) avant d'être « flash coolés » par trempage rapide dans de l'azote liquide, ou indirectement dans un flux d'azote gazeux à 100 K. Pour nos cristallisations, nous avons introduit le ligand dans la solution de porine (~ 64 μ M) à des concentrations variables (1mM à 250 mM, selon la solubilité du composé), avant de procéder à la cristallisation dans les conditions natives.

II-3: Collecte et traitements des données

Les collectes de données ont été réalisées à l'ESRF, sur l'une ou l'autre des quatre lignes de lumières suivantes :

- ID 23-2 qui a une énergie fixe de 14.2 keV (0.873 Å) et délivre un faisceau de 5x5 μ m². Cette ligne est conçue pour les microcristaux.
- ID 23-1 qui a une énergie modulable (5-20 keV) et délivre un faisceau de 30x40 μ m². Cette ligne est plus adaptée aux cristaux de taille plus élevée.
- ID14-4 qui a une énergie modulable (9-14.5 keV) et délivre un faisceau de 20x20 μ m². Cette ligne est adaptée aux cristaux de taille moyenne.
- ID 29-1 qui a une énergie modulable (6-20 keV) et délivre un faisceau de 50x60 μ m². Cette ligne permet de travailler sur des cristaux de 10 à 100 μ m grâce à la présence d'ouvertures de dimensions variables (75, 50, 30, 20 et 10 μ m). Elle est par ailleurs

équipée d'un détecteur Pilatus très sensible et permettant une écriture ('read-out') très rapide des clichés de diffraction.

Pour chaque cristal de porine obtenu, nous avons collecté 180 images avec une oscillation de 1° par image. Les données furent indexées et intégrées grâce au logiciel XDS, puis mises à l'échelle par XSCALE¹¹³. Pour chaque structure, nous avons limité l'intégration au nombre d'images permettant d'obtenir la plus haute redondance sans signe apparent de dommage d'irradiation dans les statistiques. La juste attribution du groupe d'espace, ainsi que l'absence de 'twinning' et de pseudo translocation, a été vérifiée grâce au logiciel XTRIAGE de la suite PHENIX.

La collecte de données sur les peptides LGNY et GVVTSSE a été effectuée sur ID23-2, une ligne de lumière conçue pour les microcristaux (la taille du faisceau utilisée est de 5x5 μm^2). Les microcristaux furent montés délicatement sur un micro capillaire de verre et « flash coolés » délicatement dans le flux d'azote à 100 K, sans aucune étape de cryoprotection. En effet, la faible teneur en solvant au sein de ces microcristaux rend impossible la cristallisation de l'eau dans leurs canaux de solvant. En pratique, nous avons collecté 40 images avec une oscillation de 5 ° par image. Les données ont été indexées et intégrées à une résolution de 0.8 Å pour LGNY et 1.7 Å pour GVVTSSE grâce à XDS, puis mises à l'échelle grâce à XSCALE.

II-4: Phasage et affinement des structures

Les structures des différentes porines ont été phasées par remplacement moléculaire. Le modèle atomique a ensuite été modifié et affiné manuellement, dans l'espace réel, et informatiquement, dans l'espace réciproque. Pour phaser la première structure d'Omp-Pst1-ATCC (forme A), nous avons généré un modèle grâce au programme MODELLER¹¹⁴ en utilisant comme structure de départ la porine OmpF d'*E. coli*. Ce modèle a été utilisé par PHASER¹⁰⁵ pour le remplacement moléculaire. Dans la maille, on ne trouve qu'un seul trimère d'Omp-Pst1-ATCC, ce qui correspond à un pourcentage de solvant de 75%. Pour phaser la structure d'Omp-Pst2-ATCC ainsi que celles des variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques, nous avons également utilisé MODELLER pour générer des modèles homologues, mais en prenant comme point de départ la structure d'Omp-Pst1-ATCC. Dans tous les cas, les pourcentages de solvant sont supérieurs ou égaux à 67 %.

Selon la hauteur de la résolution (et donc selon le nombre d'amplitudes de facteurs de structure uniques enregistrées) et étant considéré le nombre d'atomes dans notre protéine, nous avons pu affiner plus ou moins de paramètres. Pour les variantes sauvages d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2, nous avons affiné les positions (x, y, z) et les facteurs B individuels de chaque atome. Nous avons également affiné les paramètres TLS de la molécule (déterminé sur le serveur en ligne « TLS Motion Determination » (TLSMD)), lesquels rendent compte de mouvements collectifs d'atomes dans la maille. L'utilisation de la TLS permet de distinguer les désordres résultant de mouvements collectifs d'atomes de ceux résultant de mouvements individuels, lesquels seraient sinon convolués dans la valeur du facteur B. Nous avons par ailleurs imposé des restrictions (mais pas de contraintes) entre atomes équivalents dans chacun des monomères du trimère (ou du dimère de trimère). Cette stratégie d'affinement, et plusieurs cycles de reconstruction manuelle dans Coot ¹¹⁵, ont permis d'obtenir des structures interprétables et de bonne qualité pour les résolutions considérées. Pour les structures résolues à des résolutions moindres que 3.5 Å, (donc typiquement pour Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16 résolues à 4.5 et 5.5 Å de résolution, respectivement) notre approche d'affinement a été adaptée. D'abord, nous avons utilisé des restrictions plus fortes entre atomes équivalents dans chacun des monomères du trimère. Nous avons également utilisé des restrictions sur les structures secondaires, ce qui a permis de maintenir stable le tonneau beta. Nous avons enfin utilisé des facteurs B groupés, (*i.e.* un seul B facteur par résidu) et pris avantage de l'approche de « Jelly body refinement », ¹¹⁶ qui impose des restrictions sur les variations de distances interatomiques non-covalentes. Ceci a permis d'éviter un dépliement partiel de la protéine durant l'affinement, ce qui est commun pour les structures à basse résolution.

En ce qui concerne les peptides, la hauteur de la résolution et la taille relativement petite de la maille ont permis le phasage de la structure de LGNY par méthode directe en utilisant les logiciels SHELX C/D. Les microcristaux de GVVTSSE n'ont quant à eux diffracté qu'à 1.7 Å de résolution, ne permettant le phasage que par remplacement moléculaire. Nous avons donc, à dessein, utilisé des modèles générés manuellement jusqu'à une solution de phasage soit obtenue ^{106, 107}.

III- La diffusion dynamique de la lumière

Nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering) afin de déterminer la distribution de tailles des liposomes préparés au cours de cette étude. Cette technique d'analyse spectroscopique permet d'accéder à la taille de

particules en suspension. Cela est réalisé grâce à un faisceau laser incident illuminant ces particules en solution. Le mouvement brownien de ces particules (mouvement aléatoire provoqué par les impacts des molécules de solvant sur la surface de particule), en solution, résulte en la diffusion de la lumière du laser à différentes intensités. La fréquence de ce mouvement brownien dépend de deux paramètres principaux, la taille des particules ainsi que la viscosité du solvant. Le déplacement des particules en fonction de la concentration est ainsi caractérisé par le coefficient de diffusion de translation (D_T) qui est liée à la valeur du diamètre hydrodynamique (taille de la particule entourée de sa couche de solvation) d'après la loi de Stokes-Einstein.

$$d_h = \frac{k_b T}{3\pi\eta_0 D_T}$$

, où d_h est le diamètre hydrodynamique, k_b est la constante de Boltzmann, T la température, η_0 est la viscosité du solvant et D_T le coefficient de diffusion.

Estimation du pourcentage du détergent dans les solutions concentrées de porines par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants. Elle est basée sur la différence d'affinité des substances à analyser, à l'égard de deux phases, l'une fixe et l'autre mobile. La phase fixe consiste en une plaque de silice (TLC gel 60 F254, Merck). Nous avons utilisé la CCM pour estimer la concentration en LDAO dans nos solutions concentrées de porines, *i.e.* celles obtenues après purification et concentration à 6.5 mg/ml. À environ 1 cm du bas de la plaque, et à environ 0.7 cm les uns des autres, nous avons déposé – de gauche à droite – 10 μ l de solutions de LDAO à différentes concentrations, puis un volume identique de chacune de nos solutions concentrées de porines (Omp-Pst1 et Omp-Pst2) diluées soit deux, soit dix fois dans du tampon sans détergent (*i.e.* 3.25 et 0.65 mg/ml, respectivement). La plaque est ensuite placée dans la cuve contenant la phase mobile, un mélange chloroforme/méthanol/eau, à 65/35/5 v/v/v. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe permettant ainsi la séparation des constituants du mélange. La plaque est ensuite vaporisée d'un mélange de sulfate de cuivre à pH acide (0.1% dans du méthanol, 4% acide sulfurique, 4% acide phosphorique) avant d'être transférée sur un bloc chauffant jusqu'à séchage complet et révélation des composés d'intérêt.

Mesures du diamètre hydrodynamique des protéoliposomes

Pour mesurer le diamètre hydrodynamique des liposomes et protéo-liposomes, nous avons recours à la diffusion dynamique de lumière (DLS). Nous préparons une solution de LUV de 60 nm de rayon à une concentration finale de 1 nM (en liposomes, pas en lipides) suivant la méthode de réhydratation des films lipidiques décrite dans la section Méthodologie. En bref, 500 μ l d'une solution de phosphatidylcholine (POPC) à 20 mg/ml dans du chloroforme sont à sécher sous flux d'azote dans un tube de verre. Le film séché est ensuite réhydraté dans du tampon phosphate à 0.1 M et à pH 4, 5, 6, 7 ou 8. Les liposomes sont ensuite préparés par *freeze-thawing* (20 cycles de congélation dans l'azote liquide et de décongélation dans un bain marie à 37°) et extrusion (mini-extruder et filtres de polycarbonate calibrés à 50 nm, Avanti Polar Lipids). La génération des protéoliposomes est effectuée par incorporation des porines dans la membrane liposomale suivant la méthode de dilution du détergent. Les protéines Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont ainsi ajoutées à des concentrations finales de 0.01, 0.05, 0.1 et 1 μ M, soit des ratios théoriques de 10, 50, 100 et 1000 porines par liposome, respectivement. En pratique, 60 μ l de liposomes sont déposés dans une cuvette et une première mesure est réalisée, puis 1 μ l de la solution de porine est ajouté, mélangé, et la taille des protéoliposomes formés mesurée en fonction du temps par DLS. La chromatographie sur couche mince (CCM) indique que les solutions concentrées d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 contiennent 0.24 et 0.16 % de LDAO, respectivement. Toutes nos mesures de diffusion dynamique de lumière sont donc réalisées à des concentrations en LDAO très largement inférieures à sa CMC (0.023%), typiquement 0.0001, 0.0002, 0.0004 et 0.004 % pour Omp-Pst1 et 0.0007, 0.00013, 0.00026 et 0.0026 % pour Omp-Pst2. Afin de vérifier l'effet du détergent, en absence des porines, sur la stabilité des liposomes, nous avons suivi la turbidité, à plusieurs longueurs d'onde, des liposomes en présence d'un gradient de concentration en LDAO allant de 0 à 0.4 % (30 mM). Brièvement, des liposomes de 60 nm de rayon à une concentration finale de 1 nM sont préparés comme décrit précédemment à une concentration finale de 1 nM puis 60 μ l sont incubés pendant 30 min en présence du LDAO à la concentration désirée (0-0.4 %). Le mélange est ensuite transféré dans une cuvette où un spectre d'absorption à plusieurs longueurs d'onde dans le visible (300 à 700 nm) est enregistré sur un nanodrop équipé d'une chambre à cuvette (nanodrop 2000 c, Thermo Sci). Notons que nous ne présentons que les mesures à 400 nm dans le chapitre résultat et discussion (Figure 54). La reproductibilité des mesures est réalisée sur deux préparations de

liposomes différentes. Nos contrôles indiquent qu'en dessous de 3.5 fois la CMC et pour une concentration de liposome finale de 1 nM, la présence de détergent n'affecte pas la structure des liposomes (Figure 54). Après mesures des spectres d'absorptions, la taille et l'hétérogénéité du mélange liposomes/détergents est vérifié par DLS (DynaPro Nanostar, Wyatt Technology). Pour éviter les variations d'états liées à la température, toutes les expériences ont été réalisées dans une enceinte thermostatée à 25 °C.

Préparation des gradients de sucrose

Nous avons utilisé la méthode de séparation sur gradient de sucrose afin d'évaluer le taux d'incorporation réel des porines au sein des liposomes. Dans un premier temps, nous avons mélangé 200 µl d'une solution de protéoliposomes (30 min d'incubation des porines avec les LUV de 60 nm de diamètre) avec 200 µl d'une solution de sucrose à 60%. Nous avons ajouté au mélange du Triton X100 à une concentration finale de 0.02% afin de rendre la membrane des liposomes perméable au sucrose. Nous avons également ajouté de l'ANS (acide 8-anilino-1-naphthalenesulfonique; concentration finale: 4 µM), une sonde fluorescente qui se lie spécifiquement aux régions hydrophobes et qui fluoresce après excitation dans l'ultraviolet. La préparation du gradient est une étape délicate et se réalise avec soins. Dans un premier temps, nous avons transféré les 400 µl contenant les agrégats liposomaux à 30% de sucrose dans un tube de 3 ml. Nous avons ensuite successivement déposé 600 µl de solutions à 20, 10 et enfin 5 % de sucrose. Après dépôt, le tube subit une centrifugation à 25 000 rpm pendant la nuit à 4 °C. Nous avons utilisé des rotors à godets mobiles qui se réorientent horizontalement sous l'effet de la force centrifuge (TLS 55, Beckman). Les différents constituant présentes dans le mélange (liposomes vides, protéoliposomes et agrégats protéiques) sédimentent jusqu'à ce qu'ils atteignent la zone du gradient de sucrose dont ils partagent la densité. Les tubes sont ensuite illuminés sous une lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes au sein du gradient puis les fractions d'intérêt sont récupérées par pipetage dans des tubes eppendorfs séparés. Ces tubes sont chauffés à 90 °C pendant 5 min pour dénaturer les trimères de porines (120 kDa) en leur forme monomériques (40 kDa). Ces fractions sont ensuite concentrées sur des mini-concentrateurs (Amicon) possédant un *cut-off* de 30 kDa, à 13 000 g et pendant 15 min. Le surnageant retenu sur le filtre est ensuite déposé sur gel SDS PAGE à 12 %. Après migration, le gel est coloré au bleu de Commassie.

IV- La microscopie électronique

La microscopie électronique est une méthode unique en ce qu'elle permet l'observation, à de résolutions pouvant aller jusqu'à l'angström (Å), des objets biologiques dans l'espace direct. Son principal défaut est que les électrons interagissent très fortement à la matière, ce qui réclame de n'utiliser que des échantillons très fins. Un autre problème inhérent à cette interaction est l'absence de contraste dans les micrographies. Pour y pallier, on aura souvent recours à la coloration négative. Pour étudier des objets biologiques épais, on procédera à des coupes ultrafines de l'échantillon. Toutes les expériences de microscopie électronique décrites dans ce manuscrit ont été réalisées en collaboration étroite avec Daphna Fenel, Benoit Gallet et Guy Schohen de la plate forme de microscopie électronique de l'IBS.

IV-1 : La coloration négative

La coloration négative consiste à augmenter le contraste d'une micrographie grâce à l'utilisation d'un colorant contenant des atomes lourds. En effet, le matériel biologique ne contient, sauf exception, que peu d'atomes lourds, et son pouvoir diffusant sera donc limité. Le dépôt de métaux lourds sur les bords d'un échantillon biologique permettra donc d'en observer l'empreinte, d'où le terme coloration négative. Dans notre thèse, nous avons utilisé cette approche pour visualiser soit des liposomes soit des cellules. Nos protocoles sont détaillés ci après.

Visualisation de l'agrégation des liposomes

Des liposomes de type LUV et d'un diamètre de 400 nm sont préparés selon la méthode de réhydratation des films lipidiques décrite dans le chapitre méthodologie (§ I.3), à une concentration finale de 0.95 nM (en liposomes, pas en lipides). Brièvement, 500 μ l d'une solution à 20 mg/ml de palmitoyl-oleyl phosphatidyl choline (POPC) solubilisés dans du chloroforme sont déposés dans le fond d'un tube, avant d'être évaporés sous flux d'azote (2 h). Le film est ensuite réhydraté par un tampon MES pH 6.5, 150 mM NaCl. 20 cycles de congélation et décongélation permettent l'obtention de liposomes unilamellaires, puis 10 extrusions permettent leur calibration. En pratique, nous avons réalisé nos extrusions grâce à un mini-extrudeur de chez Avanti Polar Lipids. L'incorporation des porines dans les liposomes a ensuite suivie la méthode de dilution du détergent sous sa CMC décrite dans la section Méthodologie. Les protéines Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont ainsi ajoutées à des concentrations finales de 0.01, 0.1, 1 et 10 μ M, ce qui correspond à des ratios théoriques de 10, 100, 1000 et 10 000 porines par liposome, respectivement. Les concentrations finales en

détergent (après dilution) sont donc 4×10^{-6} , 4×10^{-5} , 4×10^{-4} et 4×10^{-2} % pour Omp-Pst1, et 2.6×10^{-6} , 2.6×10^{-5} , 2.6×10^{-4} , 2.6×10^{-2} % pour Omp-Pst2. Après incubation de 20 secondes, le mélange est déposé sur une grille de microscopie électronique (en cuivre, recouverte d'un film de carbone), coloré à l'acétate d'uranyle à 2% pendant 30 secondes, puis observé sous le microscope (CM12). Les transformées de Fourier sont générées grâce aux logiciels Gatan Digital Micrograph ou Image J.

Visualisation des biofilms 2D

Les biofilms sont dits interstitiels lorsqu'ils forment une monocouche sur une surface. Pour les visualiser, nous avons également fait appel à la microscopie électronique et à la coloration négative. En pratique, nous avons directement placé nos grilles de microscopie électronique sur la surface d'une boîte de pétri sur laquelle venait d'être étalée une solution concentrée des bactéries ($DO_{600} \sim 1 - 1.5$). L'ensemble fut mis sous incubation à 37 °C pendant 4 heures, puis la grille fut délicatement prélevée à l'aide d'une pince, colorée (comme précédemment indiqué) puis observée.

Visualisation des fibres peptidiques formées en solution

Les segments peptidiques LGNY et GVVTSSE furent synthétisés par CsBio Co (USA). Les segments furent incubés à 25 °C, dans une plaque de 24 puits (Greiner) suivant un gradient de concentration (1 μ M, 10 μ M et 100 μ M) et en présence d'un tampon favorisant la fibrillation (150 mM HEPES à pH 7.4, 150 mM NaCl et 25 μ M Thioflavine T). La turbidité est ensuite suivie à 490 nm en fonction du temps dans un lecteur de plaque (Synergy plate reader, Biotek). A la fin de la cinétique, 20 μ l de chacune des différentes solutions peptidiques furent déposés sur une grille, puis visualisés au microscope électronique CM12 LaB6 après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% à pH 4.5.

IV-2: La méthode des coupes ultrafines

La forte d'interaction des électrons avec la matrice empêche l'observation d'échantillons trop épais. Quand la nature de l'échantillon l'exige, on a donc recours à des coupes dites « ultra-fines » de l'échantillon biologique. Ainsi, on pourra accéder à un meilleur contraste et visualiser plus de détails sur l'image. Les coupes réclament, cependant, une fixation des échantillons ainsi que leur imprégnation dans une résine. Au cours de cette thèse, deux méthodes ont été utilisées pour fixer les échantillons à couper, soit la cryofixation à très

haute pression (2 kbar), soit la fixation chimique. Ensuite, le solvant baignant les cellules a été échangé contre une résine, soit à froid ($< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$), soit à température ambiante. Nos protocoles sont détaillés ci après. Dans les deux cas, nous avons utilisé de la résine EPON. Celle-ci se compose d'un monomère (la résine à proprement parler), d'un durcisseur et d'un accélérateur. Plusieurs étapes d'imprégnation sous l'effet de la température ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24-48 h). Les résines EPON polymérisées présentent une très bonne dureté, mais elles sont très peu perméables après polymérisation prohibant tout marquage post-inclusion. Au cours de la préparation de l'échantillon, des étapes de coloration supplémentaires peuvent être ajoutées afin de renforcer le contraste des images. On aura recours à l'acétate d'uranyle ou au tétra oxyde d'osmium.

Réalisation des coupes ultrafines sur des biofilms bactériens (3D) après fixation chimique

Afin de révéler si des contacts intercellulaires sont présents au sein des biofilms bactériens de grande taille (3D), nous avons eu recours à la technique des coupes ultrafines après fixation chimique. Une colonie bactérienne de la boîte de gélose exprimant la porine d'intérêt est transférée dans une pré-culture de 1 ml en présence des deux antibiotiques, l'ampicilline à $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ et la kanamycine à $25\text{ }\mu\text{g/ml}$, puis incubée pendant la nuit à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation. Le lendemain, 200 ml d'un nouveau milieu LB sontensemencés à partir de cette pré-culture puis incubés à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation jusqu'à ce que la DO_{600} atteigne une valeur entre 1.5 et 2. Plusieurs aliquots de $200\text{ }\mu\text{l}$ sont ensuite transférés dans une plaque multi-puits (24 puits) à fond de verre (Matek Corporation). La présence des bactéries adhérentes sur la surface de la lame de verre est d'abord vérifiée par microscopie confocale. Le milieu LB est ensuite aspiré délicatement à l'aide d'une pipette puis remplacé par une solution fixatrice (2% para-formaldéhyde et 0.2% glutéraldéhyde) diluée dans un tampon cacodylate (0.1 M, pH 7.2), pendant 2 heures. Notons que le formaldéhyde est une molécule de taille inférieure au glutéraldéhyde, et qui permet donc de mieux conserver les épitopes. La solution de fixation est ensuite éliminée par trois lavages successifs avec un tampon cacodylate (0.1 M, pH 7.2). Les échantillons subissent une étape coloration post fixation pendant 1 heure à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en présence de tétra oxyde d'osmium (1%). Le colorant est ensuite rincé par trois étapes de lavage successives à l'eau distillée. Une étape de coloration supplémentaire, est également réalisée, en présence d'acétate d'uranyle à 0.5% (pH 4) et pendant 1 heure. Les échantillons subissent ensuite une déshydratation progressive. Celle ci réclame leurs immersions successives dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (30, 60 et 90%, respectivement). Trois incubations supplémentaires de 10 minutes dans 100%

d'éthanol sont également réalisées. Les échantillons sont alors imprégnés par un mélange équimolaire de résine EPON et d'éthanol pur pendant 2 heures, avant d'être transférés dans une solution de résine EPON pure et mis à polymériser à 60°C pendant 48 heures. Les blocs de résine EPON polymérisés sont ensuite démoulés en trimant le bloc (EM Trim, Leica Microsystems). Des coupes de 80 à 120 nm d'épaisseur sont ensuite réalisées grâce à un ultra microtome (UC7 ; Leica Microsystems), déposées sur des grilles en cuivre et imagées par microscopie électronique (CM12, Phillips).

Réalisation des coupes ultrafines sur des biofilms bactériens (3D) après fixation physique

Afin de déterminer si des contacts intercellulaires pourraient avoir lieu au sein de biofilms bactériens de grande taille (3D), nous avons eu recours à la technique des coupes ultrafines après fixation physique. Les bactéries sont mises en culture à 37 °C dans du milieu LB jusqu'à ce que leur densité optique à 600 nm atteigne 1.5. Les bactéries subissent d'abord une étape de fixation physique par cryocongélation sous haute pression (2 kbar) grâce au système HPM100 (Leica Microsystems). Pour ce faire, un faible volume de la solution de culture est déposé dans une cupule d'or ou de cuivre (1.2 µl). Les échantillons vitrifiés sont ensuite transférés dans un système de cryo-substitution pré-refroidi à -90 °C. Ils subissent ainsi une cryo-substitution en acétone/tétra oxyde d'osmium (1%) (AFS2 ; Leica Microsystems) en même temps que la température est progressivement remontée: (1) L'échantillon subit une stabilisation pendant une durée de 72 heures à température constante de -90 °C, suivi d'une augmentation de la température à 2 °C/heure jusqu'à -60 °C. (2) Une deuxième étape de stabilisation pendant une durée de 10 heures à -60 °C, suivi d'une augmentation de 2 °C/heure jusqu'à -30 °C. (3) Une dernière étape de stabilisation de 10 heures à -30 °C, suivi d'une étape de lavage à l'acétone pur répétée quatre fois (-30 °C). A ce stade, une étape d'imprégnation de l'échantillon est réalisée par un mélange acétone/EPON (2/1) pendant 2 heures en remontant la température à -10 °C. Une deuxième étape d'imprégnation est ensuite réalisée par un mélange acétone/EPON, à un rapport massique de 1/1, pendant 2 heures en remontant la température à 10 °C. La troisième étape d'imprégnation est réalisée par un mélange acétone/EPON, selon un rapport massique de 1/2, pendant 2 heures en remontant la température à 20 °C. Les échantillons sont enfin placés dans de la résine EPON pure et mis à polymériser à 60 °C pendant 48 heures. Les blocs de résine EPON polymérisés sont ensuite démoulés puis les coupelles retirées en trimant le bloc (EM Trim, Leica Microsystems). Des coupes de 80 nm d'épaisseur sont ensuite réalisées sur un ultra microtome (UC7, Leica Microsystems). Celles ci sont déposées sur des grilles en cuivre et

imagées sur un microscope électronique CM12 (Phillips) à 80 kV.

V-La microscopie d'épifluorescence

Grace à sa sensibilité intrinsèque élevée, la microscopie d'épifluorescence est une technique souvent utilisée en biologie. Elle permet de surmonter certaines limitations de la microscopie de fluorescence classique grâce à une configuration utilisant des cubes constitués de deux filtres et un miroir dichroïque. Ce dispositif permet de réaliser un filtrage spectral efficace, en limitant la perte du signal de fluorescence et en éliminant les signaux parasites qui sont réfléchies grâce à un miroir dichroïque. Nous avons exploité ce type de microscopie avec l'aide de Françoise Lacroix et Jean-Philippe Kleman de la plateforme M4D à l'institut de biologie structurale.

V-1: Marquage des liposomes

Préparation des LUV fluorescents

De la lissamine rhodamine B (Liss Rhod B), un lipide fluorescent, est ajouté à une préparation de lipides non fluorescents vouée à former des liposomes. En pratique, on mélange directement les solutions chloroformées de lipides ; les lipides fluorescents comptent pour 1% de la masse lipidique totale. Le mélange lipidique subit une évaporation de son solvant organique dans une ampoule rotative, pendant 2 heures, sous flux d'azote jusqu'à formation d'un film lipidique. Une étape de réhydratation du film dans du tampon MES pH 6.5 en présence de NaCl à 150 mM est ensuite réalisée, avant des cycles de congélation et de décongélation (20 cycles). A ce stade, les liposomes LUV marqués par des lipides fluorescents sont formés. Une dernière étape d'extrusion permet d'ajuster la taille de ces derniers (mini-extrudeur avec des filtres polycarbonate; Avanti Polar Lipids).

Préparation des GUV fluorescents

Un mélange de POPC, lissamine rhodamine B et du cholestérol, est préparé à des proportions massiques de 88%, 2% et 10%, respectivement. Un volume de 10 µl du mélange lipidique est ensuite déposé sur une lame de verre ITO (Indium Tin Oxyde) conductrice. Suite à l'évaporation du solvant et la formation d'un film lipidique, une étape de réhydratation est réalisée par simple dépôt de 160 µl d'un tampon (5 mM HEPES à pH 7 et 200 mM sucrose). Une deuxième lame est ensuite posée délicatement par dessus de la première, emprisonnant

ainsi le film recouvert de la solution aqueuse entre deux lame ITO. Finalement, un champ électrique est appliqué en utilisant le système « Vesicle Prep Pro » (Nanion Technologies). Les GUV sont ainsi formées et peuvent être récupérées délicatement par un simple pipetage. La préparation des liposomes géants suivant cette méthode ne permet pas une estimation précise de la concentration finale en liposomes puisque seule une fraction des lipides déposés se voit transformée en GUVs, lesquels ne sont, par ailleurs, pas calibrés.

Visualisation de l'agrégation des liposomes en épifluorescence

Pour visualiser le phénomène d'agrégation des liposomes au microscope d'épifluorescence, des plaques multi-puits (24 et 96 puits) à fond de verre ont été utilisées (Matek Corporation). Une étape de pré-fonctionnalisation des plaques est nécessaire pour éviter l'adsorption des liposomes à la surface. Cette étape consiste à incuber les plaques 15 min en présence de 50 µg/ml BSA à température ambiante. L'excès de BSA est éliminé par lavage avec un tampon salin (PBS). La solution de liposomes (60 µl) est déposée dans les puits traités par la BSA, puis la solution de porine est ajoutée et mélangée (1 µl). L'insertion des porines dans les liposomes se produit par simple dilution du détergent à une concentration en dessous de sa CMC (§ I.3). Les GUV marqués sont incubés avec les porines pour 30 min, à des concentrations finales de 0.01, 0.1 et 1 µM, respectivement, soit des concentrations en LDAO de 4×10^{-5} , 4×10^{-4} et 4×10^{-3} % pour Omp-Pst1 et 2.6×10^{-5} , 2.6×10^{-4} et 2.6×10^{-3} % pour Omp-Pst1. Les plaques sont visualisées par un microscope inversé (IX81 Olympus) et sous grossissement de 60X (Plan APON60XO ; Olympus) avant et après incubation des liposomes en présence des porines.

Echange de la fluorescéine au sein des canaux dimeriques des porines incorporées dans des GUV

Deux populations de GUV sont préparées et marquées suivant la méthode de gonflement des films lipidiques sous champ électrique ou « electro-swelling » décrite dans la section méthodologie (§ I.3). La première population est constituée par des liposomes non marqués, composés de diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) et qui contiennent de la fluorescéine encapsulée dans leur lumen (§ I.5). La deuxième population est constituée de liposomes marqués à la lissamine rhodamine (Liss Rhod B), mais ne contenant pas de fluorescéine. Les deux populations de liposomes sont mélangées (30+30 µl) en présence des porines à une concentration finale de 1.3 µM (4.8×10^{-3} % LDAO pour Omp-Pst1 et 3.2×10^{-3} % LDAO) et pendant 90 min. Les échantillons sont déposés dans une plaque multi puits

(Matek) à fond de verre après « coating » de la surface de verre par la BSA (comme décrit précédemment). Ils sont visualisés sous microscope inversé (IX81 Olympus) et avec un grossissement de 60X (Plan APON60XO, Olympus) avant et après incubation des GUV en présence des porines.

V-2: Marquage des bactéries

Des colonies bactériennes sont transférées dans des pré-cultures de 25 ml puis incubées pendant la nuit à 37 ° C sous agitation. A une DO_{600} de 2.5, ces cellules sont mises en présence de Hoeschst, un agent fluorescent qui s'intercale dans l'ADN, à une concentration finale de 5 μ M et pendant 30 min. Les bactéries sont ensuite diluées à une DO_{600} finale de 1, dans du milieu LB. Elles sont finalement transférées dans une plaque multi puits à fond de verre (Matek Co.) où elles sont visualisées dans une enceinte thermostatée à 37 °C sous microscope inversé (IX81 Olympus). Les images sont collectées sous grossissement de 60X (Plan APON60XO, Olympus).

VI- La microscopie à force atomique (AFM)

Chaque microscopie a son champ d'application. Ainsi, nous avons eu recours à la microscopie à force atomique pour caractériser des échantillons quasi-cristallins formés par les porines suite à leur insertion dans des liposomes. Les expériences ont été réalisées en collaboration avec Jean Luc Pellequer, Michael odorico et Jean-Michel Teulon du CEA de Marcoule.

Visualisation de la surface topographique de cristaux 2D protéoliposomaux

Les liposomes de type LUV et d'un diamètre de 400 nm sont préparés à une concentration finale de 0.95 nM suivant la méthode de réhydratation des films lipidiques, décrite dans la section méthodologie (§ I.3). La formation des protéoliposomes cristallins est effectuée par incorporation directe suivant la méthode de dilution de la solution protéique au dessous de la CMC. Les porines Omp-Pst2 purifiées sont ensuite incorporées à une concentration finale de 10 μ M. En pratique 10 μ l de la solution protéique à 60 μ M est ajoutée à 60 μ l de la solution de liposomes (diamètre 400 nm). La concentration en LDAO est alors de 0.04 % (~ 2.95 mM) pour Omp-Pst1 et 0.026 % (1.92 mM) pour Omp-Pst2. Le mélange est ensuite dilué deux fois avec du tampon MES 10 mM pH 6.5, 15 mM NaCl. A ce stade, la concentration en LDAO est de 0.02 % (~ 1.47 mM) pour Omp-Pst1 et 0.013 % (0.96 mM)

pour Omp-Pst2. 10 µl du mélange sont ensuite déposés sur un support de Mica. Le dépôt est déshydraté pendant 6 heures sous une hotte, puis mis sous vide pendant 20 min. Le film obtenu est finalement imagé sur un microscope à force atomique (Veeco, Dimension D 3100), équipé d'un scanner hybride XYZ (Dimension Hybrid XYZ scanning probe Microscope Head). Les images sont prises en mode contact. Les images sont traitées avec le logiciel Gwyddion (www.gwyddion.net).

VII- La spectroscopie de masse MALDI

Nous avons utilisé la technique de spectroscopie de masse MALDI afin de vérifier l'identité protéique sur gel SDS Page dans un cadre collaboratif avec l'aide de Luca Signor de la plateforme de spectroscopie de masse à l'IBS. Brièvement, cette technique consiste à ioniser les macromolécules pour pouvoir les séparer et les analyser selon leur rapport masse/charge à l'aide d'un champ électrique. L'approche d'ionisation MALDI consiste à irradier un dépôt cristallin d'une matrice organique co-cristallisant avec l'échantillon. L'excitation de la matrice par le laser génère des ions moléculaires qui sont ensuite accélérés et séparés dans un tube de type temps de vol. L'étape de séparation fournit un spectre caractéristique des constituants.

Vérification de l'identité protéique sur gel

Les analyses des échantillons biologiques par la méthode de spectroscopie de masse demandent certaines précautions lors de la manipulation afin d'éviter de les contaminer avec de la kératine humaine (peau, cheveux, ongles, etc). Des colonies bactériennes des boîtes de gélose correspondantes sont transférées dans des précultures de 25 ml dans deux milieux nutritifs différents (LB et urée) puis incubées pendant la nuit à 37° C sous agitation. La composition du milieu urée synthétique est détaillée dans le tableau 5. Après avoir atteint une DO_{600} de 2, ces cellules sont centrifugées à une vitesse de 5000 rpm pendant 10 min afin de récupérer le culot bactérien. Les cellules sont ensuite cassées par sonication pour récupérer les extraits cellulaires totaux. L'échantillon est déposé, puis migré sur un gel SDS Page de 10%. Les bandes protéiques d'intérêt visualisées sur ce gel, sont excisées délicatement à l'aide d'un scalpel. Elles sont ensuite transférées, ensuite, dans des tubes en plastique de 1.5 ml (Eppendorf) où plusieurs cycles de lavages seront effectués afin d'éliminer le SDS et les sels qui peuvent interférer avec la digestion enzymatique : (a) 50 µl de NH_4HCO_3 à 25 mM pendant 30 min sous agitation (b) 50 µl de (50%) NH_4HCO_3 à 25 mM et 50 µl de (50%)

acetonitrile pendant 30 min sous agitation, cette étape a été répétée deux fois (c) 50 µl de acetonitrile (100%) pendant 5 min sous agitation. Le surnageant est éliminé entre les différentes étapes de lavages. Les échantillons subissent également deux étapes de réduction et d'alkylation permettant de rompre les ponts disulfures des protéines. La première étape en ajoutant 50 µl de DTT (Dithiothreitol) à 20 mM, pendant 30 minutes à 56 °C sous agitation et la deuxième étape en ajoutant 50 µl d'iodoacetamide à 20 mM, pendant 45 min à l'abri de la lumière et sans agitation. Les réactifs de réduction sont ensuite éliminés par des étapes de lavages successives avec l'hydrogénocarbonate d'ammonium et l'acetonitrile. Les bandes sont incubées en présence de la trypsine à 19 ng/µl et d'un surfactant (ProteaMAX surfactant) à 0.01%. Une dernière étape de lavage avec 100% acetonitrile entraînera la déshydratation du gel. C'est ainsi lors de l'ajout du tampon contenant l'enzyme et le surfactant, que les morceaux de gel vont réagir comme des éponges en aspirant le liquide, ce qui va augmenter l'efficacité de la digestion. Le mélange est finalement incubé à 37 °C pendant la nuit. La réaction enzymatique est arrêtée le lendemain par l'ajout de TFA (acide trifluoroacétique) à une concentration finale de 1%. Ensuite l'extraction des différents peptides générés par la digestion est réalisée par lavages successifs des bandes de gels comme suit : (a) 50 µl de 5% Acetonitrile et 0.1% TFA pendant 15-20 min sous agitation (b) 50 µl de 50% acetonitrile et 0.1% TFA pendant 15-20 min sous agitation, cette étape est répétée deux fois (c) 50 µl de 100% Acetonitrile sous agitation pendant 5 min. Lors de cette étape, les peptides vont diffuser de façon passive entre les morceaux de gel et le tampon. Le surnageant des différentes étapes de lavages est récupéré à la fin dans un seul tube et concentré sous vide (speedvac) jusqu'à un volume final de 10 µl. Ceci permet d'évaporer l'acetonitrile en excès avant que les échantillons ne soient analysés par MALDI-MS.

Composée	Quantité (g)	Concentration (mmol l ⁻¹)
Peptone L37	1	
Extrait de levure	0.005	
Acide lactique	0.1	1.1
Acide citrique	0.4	2
Sodium bicarbonate	2.1	25
Urée	10	170
Acide urique	0.07	0.4
Creatinine	0.8	7
Chloride de calcium.2H ₂ O	0.37	2.5
Chloride de sodium	5.2	90
Sulfate de Fer II. 7H ₂ O	0.0012	0.05
Sulfate de magnesium. 7H ₂ O	0.49	2
Sulfate de sodium.10H ₂ O	3.2	10
Potassium dihydrogeno phosphate	0.95	7
Di-potassium hydrogeno phosphate	1.2	7
Ammonium chloride	1.3	25
Eau distillée	Qsp 1 litre	

Tableau 3: Composition du milieu urée synthétique (adoptée de Brooks et al ¹¹⁷)

Résultats et Discussion

I- Étude structure-fonction des porines: un rôle dans la résistance aux antibiotiques

Afin de mieux comprendre l'implication possible d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2, les deux porines non spécifiques de *P. stuartii*, dans la résistance aux antibiotiques, nous avons mené une analyse structurale. Bien que la structure moléculaire de cette famille de protéines soit connue et bien étudiée chez *E. coli*, de nombreuses questions restent à élucider. En particulier, comment les bactéries adaptent-elles leurs porines d'un point de vue structural au cours ou suite à un traitement antibiotique? Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé nos travaux non seulement sur la variante sauvage d'Omp-Pst1 (Omp-Pst1-ATCC), mais également sur deux variantes issues d'isolats cliniques, Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16. Ces variantes ont été isolées sur des patients ayant contracté une infection nosocomiale à *P. stuartii*, et n'ayant pas guéri par le traitement classique à l'imipénème et aux fluoroquinolones. Nous allons présenter, dans une première partie, notre approche allant du gène à la structure, et qui a permis la résolution des structures tridimensionnelles d'Omp-Pst1-ATCC, d'Omp-Pst1-99645, d'Omp-Pst1-Nea16 et d'Omp-Pst2-ATCC.

I-1: Obtention des solutions protéiques pures

La première étape de notre étude structurale a été la purification des différentes porines. Cette étape a été essentielle pour obtenir des cristaux de qualité suffisante pour améliorer la résolution de leurs structures tridimensionnelles par radiocristallographie.

I-1.1: Expression, extraction et purification des porines

Expression des porines

Les différentes porines sont exprimées à l'aide d'un vecteur d'expression, pGompF, contenant un OMRS (Origin Repair Mutagenesis System). Comme montré par Prilipov et *al*¹⁰⁸, la présence d'un système OMRS au sein d'une souche bactérienne mutante induit une augmentation de l'efficacité de la mutagenèse de 46 à 75 %. Dans notre cas, le vecteur pGompF est transformé par électroporation dans une souche mutée d'*E. coli*, « BL21(DE3) Δ Omp8: Δ lamB ompF:Tn5 Δ OmpA Δ OmpC ». L'intérêt de cette souche est qu'elle est délétée pour les porines généralement exprimées par *E. coli* : Les porines non spécifiques nommément OmpF, OmpC et OmpA ainsi que la porine spécifique LamB. Nous testons l'expression, avec et sans induction à l'IPTG. Après solubilisation des membranes, l'observation sur gel SDS Page est que l'induction entraîne un surplus de production des

porines qui se traduit par leur accumulation sous forme de corps d'inclusions au lieu de leur adressage à la membrane. Elle nous apparaît par ailleurs y être en quantité suffisante. Dès lors, toutes nos expériences ont été réalisées sur des bactéries cultivées sous induction (Figure 27).

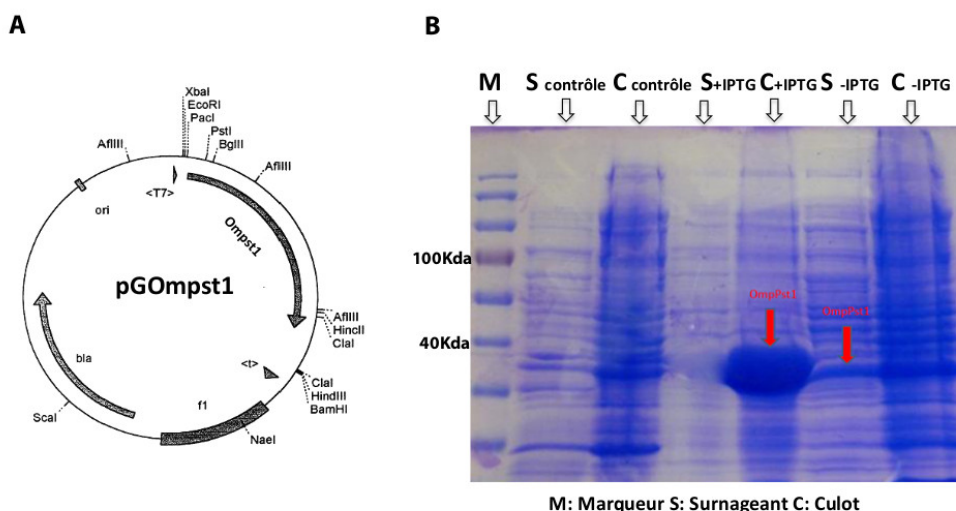


Figure 27: Stratégie d'expression des porines de *P. stuartii* dans des souches d'*E. coli* modifiées génétiquement. A/ La carte du plasmide pGOmpst1 est utilisée pour exprimer la porine Omp-Pst1 dans la membrane externe de la souche d'*E. coli* $\Delta omp8$. B/ Le gel SDS 10% polyacrylamide, coloré au bleu de Coomassie, montre l'effet de l'induction par l'IPTG sur l'expression d'Omp-Pst1-ATCC. Les porines migrent à 40 kDa après solubilisation des cellules totales dans un tampon contenant le détergent OPOE à 3%. Au préalable de la migration, les échantillons protéiques ont été chauffés à 90 °C pendant 5 min. Leur adressage cellulaire est identifié suivant qu'ils sont solubilisés dans le surnageant (S) ou dans le culot membranaire (C).

Extraction des porines

Les différentes porines sont extraites par solubilisation différentielle des membranes interne et externe avec des détergents comme précédemment décrit par Garavito et *al* pour OmpF¹¹⁸, mais avec quelques modifications. D'abord, une série de pré-extractions est réalisée pour solubiliser la membrane interne en présence d'un détergent non ionique, l'OPOE à 0.3%. La membrane externe est ensuite solubilisée en augmentant la quantité d'OPOE à 3 %, ce qui permet d'extraire Omp-Pst1 et d'autres contaminants de la membrane externe (Figure 28). C'est la rigidité plus importante de la membrane externe, conférée par la présence de LPS dans son feuillet externe, qui explique qu'elle ne se solubilise qu'à 3% OPOE et non à 0.3% OPOE comme la membrane interne. Dès la première solubilisation à ce pourcentage d'OPOE, 75% des protéines sont extraites. Cette étape est répétée plusieurs fois pour extraire la totalité de la protéine du culot. Grâce à cette approche, nous éliminons donc d'abord les contaminants de la membrane interne avant de récupérer un lysat de la membrane externe contenant principalement la porine clonée. Cette étape peut donc être considérée comme une pré

purification, permettant d'alléger le profil protéique avant le chargement du lysat membranaire sur une colonne de purification.

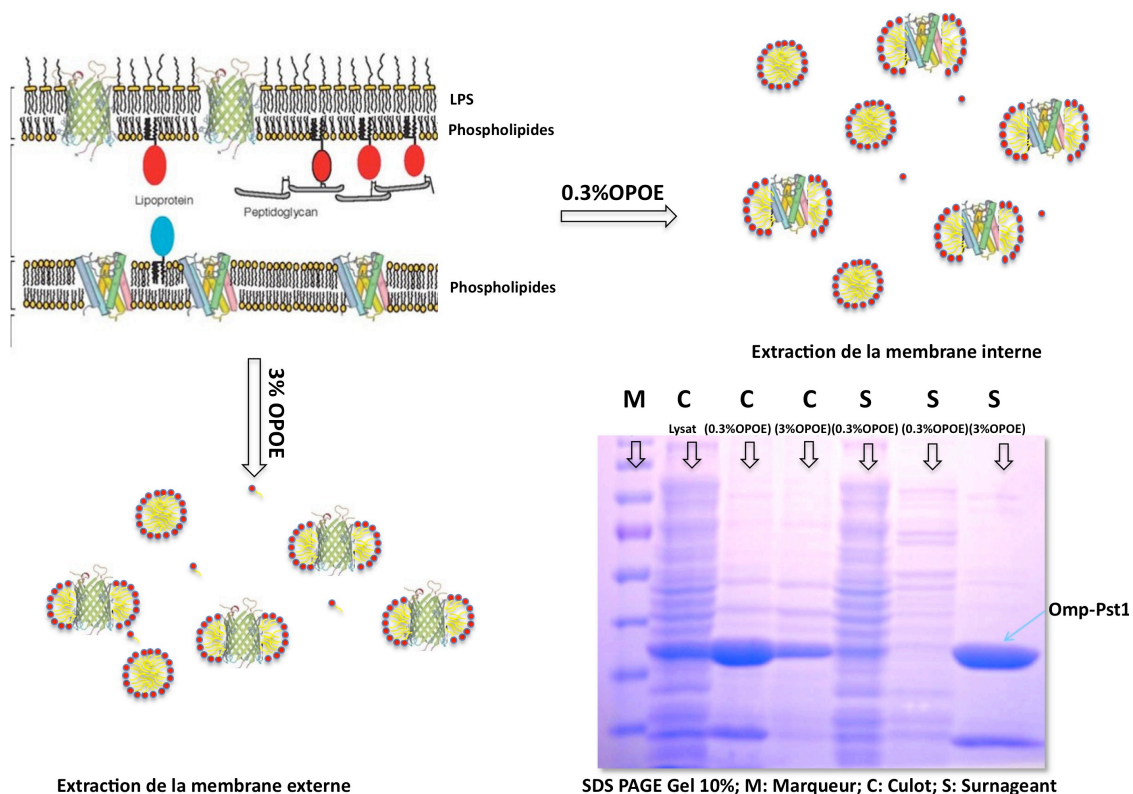


Figure 28: Stratégie d'extraction des porines à partir de la membrane externe. Une représentation schématique de la stratégie d'extraction employée par solubilisation différentielle des membranes internes, à 0.3% d'OPOE, ainsi que des membranes externes, à 3% d'OPOE. Le gel SDS 10% polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie permet de suivre les différentes étapes de l'extraction. En allant de gauche à droite, la présence d'Omp-Pst1-ATCC est vérifiée dans le lysat cellulaire du départ. Après plusieurs incubations en présence du détergent OPOE à 0.3%, les protéines de la membrane interne sont solubilisées et extraites dans le surnageant. De la même façon, après incubation des membranes en présence du même détergent mais à des pourcentages plus élevés, telle que 3% d'OPOE, les porines sont extraites des membranes externes.

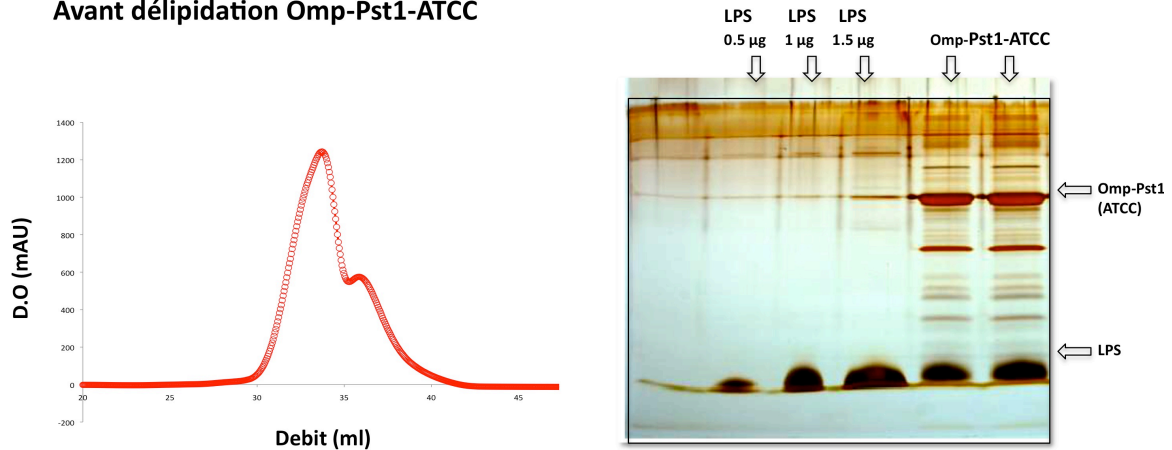
Purification des porines

La première étape de purification est une colonne échangeuse d'anions. Pour cette purification, les protéines sont mises à pH 6.5, auquel elles sont toutes chargées négativement. Les p*K*_i calculés des protéines d'intérêt dans cette étude sont 5.67, 4.54, 5.29 et 5.86 pour Omp-Pst1-ATCC, Omp-Pst2-ATCC, Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16, respectivement (web services d'ExPASy). La figure 29 A montre un profil d'élution hétérogène pour Omp-Pst1-ATCC, laquelle se décroche de la colonne à 350 mM NaCl. L'électrophorèse sur gel coloré au nitrate d'argent, associée à cette purification, révèle la présence de LPS co-purifiés avec Omp-Pst1-ATCC. Nous concluons que le profil d'élution observé en chromatographie échangeuse d'ions résulte de la présence de LPS attachés d'une manière non homogène à notre protéine. Les LPS étant chargés négativement, ils imposent un retard dans l'élution de la

protéine.

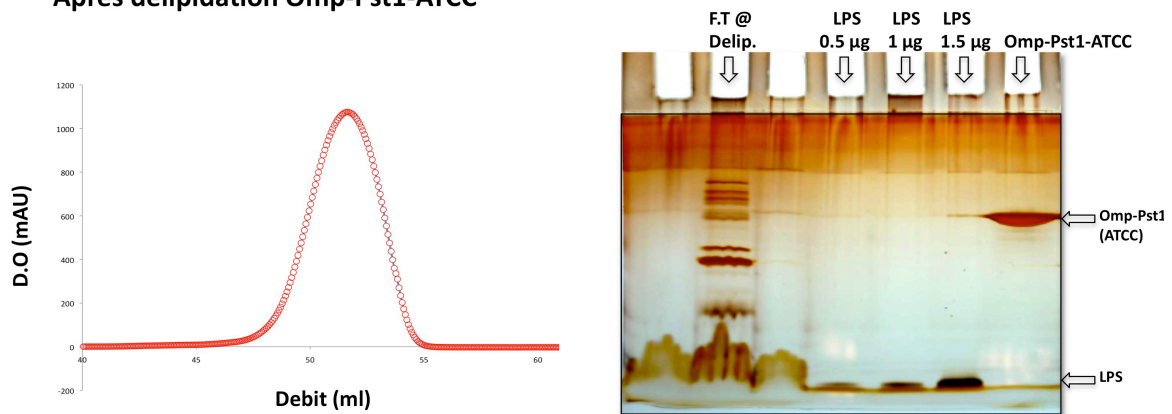
A

Avant délipidation Omp-Pst1-ATCC



B

Après délipidation Omp-Pst1-ATCC



C

Après délipidation Omp-Pst1-99645

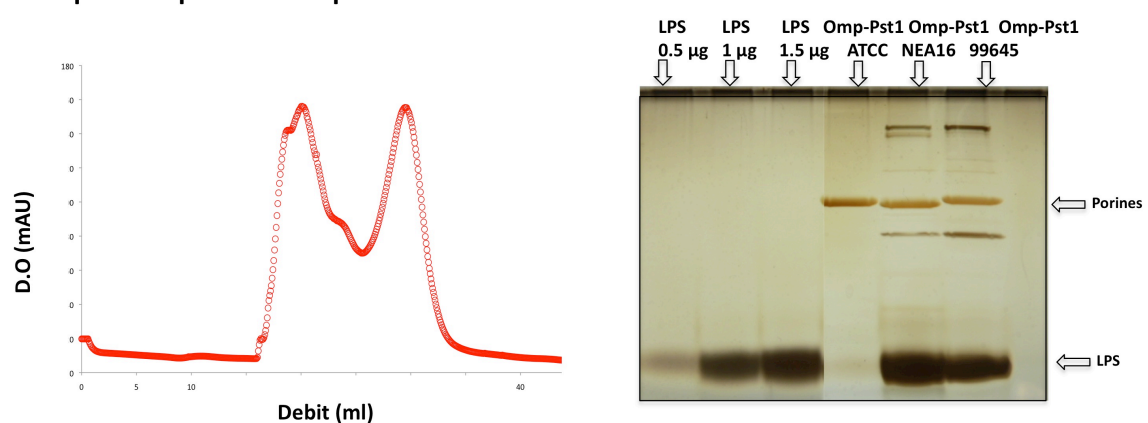


Figure 29: L'optimisation du protocole de purification des porines par l'ajout d'une étape de délipidation. A/ Le chromatogramme de la colonne échangeuse d'anions d'Omp-Pst1-ATCC, avant l'ajout d'une étape de délipidation, montre un profil hétérogène de pics. Le gel SDS 15% polyacrylamide associé à cette purification et coloré à l'argent révèle la présence des LPS copurifiés avec Omp-Pst1, ainsi que des contaminants protéiques. B/ L'ajout d'une étape de délipidation sur la purification d'Omp-Pst1-ATCC permet d'obtenir un profil homogène de pics sur le chromatogramme de la colonne

échangeuse d'anions. Le gel associé à cette purification confirme la pureté de notre échantillon protéique ainsi que l'absence des LPS. Le tampon non retenu au cours de la délipidation (Flow Through, F.T) montre la présence des contaminants protéiques et confirme par ceci l'efficacité de cette approche. C/ La même approche de délipidation, réalisée sur les variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques (Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16), n'abouti pas au même profil d'élution ni au même degré de pureté comme révélé sur le gel coloré à l'argent, par rapport à la forme sauvage. Pour les différents gels, une gamme de LPS purifiée est également représentée.

Il est cependant connu que l'interaction entre les lipides et les protéines membranaires est souvent requise pour préserver la fonction de ces dernières ¹¹⁹. Une étude de Eisele et al ¹²⁰ a démontré que les porines sont une des famille de protéines membranaires qui échappent à cette règle. En effet, ces travaux montrent qu'après dénaturation de la porine en présence de la guanidine à 6 M ou en chauffant à 95 °C en présence du SDS, la porine pourra régénérer son repliement initial et sa fonction dans un environnement amphiphile. Cette étude suggère que l'information sur le repliement des porines est présente dans sa structure primaire et ne nécessite pas d'être assistée par une chaperonne, par exemple membranaire.

Afin d'optimiser la purification, nous avons donc ajouté une étape de délipidation sur colonne en vue d'éliminer ces LPS. Durant cette étape, nous soumettons les porines à un lavage par un tampon contenant un pourcentage élevé en détergent, lequel est injecté à débit très faible sur la colonne (0.2 ml/min). Notons que le choix du détergent est primordial dans cette étape afin de maximiser la solubilisation des molécules lipidiques tout en préservant l'activité des porines. Nous décidons ainsi d'utiliser le LDAO, un détergent non ionique « doux », à 1.5% ¹²¹. Après delipidation, le profil d'élution des porines est parfait, comme le montre la figure 29 B pour Omp-Pst1. L'électrophorèse sur gel coloré au nitrate d'argent montre par ailleurs que l'échantillon ne contient plus de LPS. Nos données suggèrent que les LPS attachés aux porines entraînent une co-contamination par d'autres protéines. En effet, plusieurs contaminants sont récupérés dans le « flow through » de la delipidation. Quand le même protocole est appliqué aux protéines issues d'isolats cliniques, Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16, la contamination persiste et les profils d'élution ne sont pas améliorés par la delipidation avec le LDAO (Figure 29 C). Nous avons donc testé d'autres détergents.

Optimisation de la purification des protéines issues d'isolats cliniques

Nous faisons l'hypothèse que l'OPOE permettra une délipidation plus efficace parce que ses chaînes lipophiles (8 carbones) sont plus courtes que celle du LDAO (12 carbones) ¹²¹. Le gel de la figure 30, coloré au nitrate d'argent, montre qu'une étape de délipidation supplémentaire avec l'OPOE n'abouti pas à une élimination complète des LPS. Par contre, il

est clair que cette approche permet d'améliorer la pureté de la solution protéique en éliminant les contaminants à bas poids moléculaires (< 40 kDa).

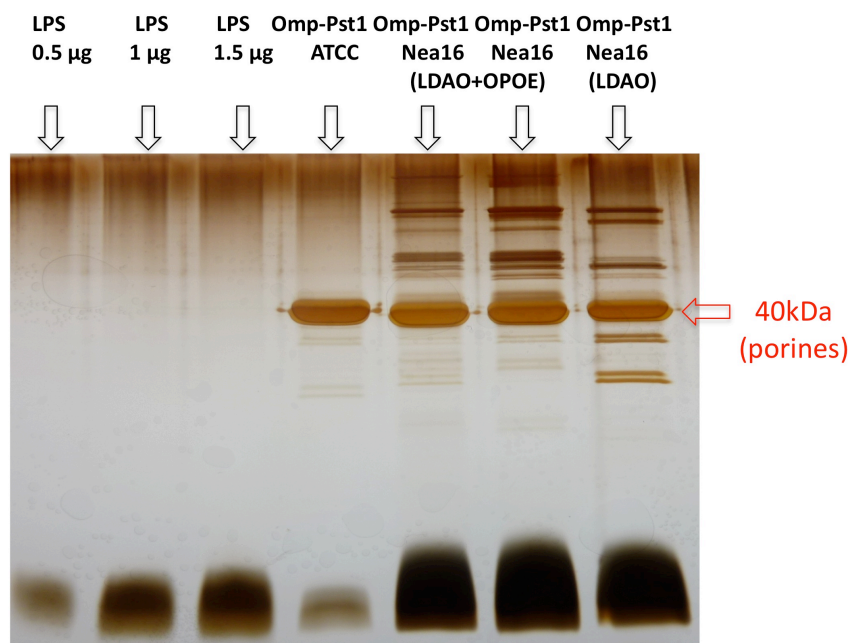


Figure 30: Gel SDS 15% polyacrylamide coloré au nitrate d'argent pour évaluer l'optimisation de la purification des variantes mutantes. Les échantillons des porines sont mis à migrer après chauffage pour 5 min à 90 °C. Allant de gauche à droite : une gamme de LPS purifiée est représentée pour la comparaison. L'échantillon d'Omp-Pst1-ATCC a subi une étape de délipidation classique avec du LDAO et montre un degré de pureté élevée ainsi que l'absence quasi complète des molécules de LPS. Les deux échantillons suivants correspondent à la même protéine Omp-Pst1-Nea16, qui a subi deux étapes de délipidation successives en présence des détergents LDAO et OPOE, respectivement. Cette approche a permis d'éliminer les contaminants à bas poids moléculaires (<40 kDa) malgré la persistance des LPS. Le dernier échantillon correspond également à Omp-Pst1-Nea16, ayant subi une seule étape de délipidation en présence de LDAO et montre la persistance des contaminants à haut et faible (<40 kDa) poids moléculaires ainsi que les molécules de LPS associées.

I-2: Obtention de cristaux de haute qualité

Afin de caractériser la structure de nos porines, nous avons eu recours à la cristallographie aux rayons X. Le préalable était, bien évidemment, l'obtention de cristaux desdites porines.

I-2.1: Optimisation de la cristallogénèse

Nous avons testé différentes conditions et méthodes de cristallisation. Dans tous les cas, nous avons fait appel à la diffusion de vapeur pour atteindre l'état de sursaturation. Pour toutes nos solutions de protéines (quelque soit le détergent ; en présence ou non de bicelles), nous avons d'abord effectué un criblage très large des conditions de cristallisation en utilisant le robot de cristallisation de l'EMBL. Nous avons ensuite repris les conditions ayant permis

d'obtenir des cristaux sur des volumes plus larges, et avons systématiquement criblé autour. La première méthode que nous avons utilisée a été celle dite en « bicelles ». Dans ce cas-là, la protéine solubilisée en détergent est mise en présence de disques lipidiques, ou bicelles, dans lesquelles les protéines membranaires, parmi lesquelles les porines, peuvent s'insérer¹⁰³. Par cette méthode, nous avons obtenu des cristaux d'Omp-Pst1-ATCC en présence de C8E4, mais ces cristaux en forme d'aiguilles n'ont malheureusement diffracté à l'ESRF qu'à 9 Å de résolution. Nous avons ensuite essayé de cristalliser les porines sans bicelles, *i.e.* juste en présence de détergent. Dans ce cas, le choix du détergent est déterminant. Les cristaux les plus volumineux et les mieux définis que nous avons obtenu pour Omp-Pst1-ATCC l'ont été en présence du LDAO et en goutte assise, et ont diffracté à 2.7-2.9 Å de résolution à l'ESRF. Forts de ce succès, nous avons repris les mêmes approches pour cristalliser Omp-Pst2 et les variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques. Les conditions de cristallisation des différentes protéines décrites dans ce manuscrit sont :

- Omp-Pst1-ATCC (A): 14% PEG6000, 0.1 M MgCl₂, 0.1 M MES pH 6,5 - diffraction à 2.7-2.9 Å
- Omp-Pst1-ATCC (B): 14% PEG6000, 0.1 M MgCl₂, 0.1 M MES pH 6.5, 10 mM vancomycin - diffraction à 3.2 Å
- Omp-Pst1-ATCC-Maltose: 14% PEG6000, 0.1 M MgCl₂, 0.1 M MES pH 6.5, 25% maltose - diffraction à 3 Å
- Omp-Pst2-ATCC : 8% PEG 6000, 0.1 M Tris pH 8, 1 M LiCl - diffraction à 2.2 Å.
- Omp-Pst1-99645 : 14% PEG6000, 0.1 M MgCl₂, 0.1 M MES pH 6.5, 0.1 M ampicilline - diffraction à 4.5 Å
- Omp-Pst1-Nea16 : 14% PEG6000, 0.1M MgCl₂, 0.1M MES pH 6.5, 5% sucrose - diffraction à 5.5 Å

Notons que nous avons également pu cristalliser nos protéines en phase lipidique cubique (*in meso*). Cependant, les cristaux obtenus n'étaient pas prometteurs en termes de taille et de définition de leurs arêtes, et n'ont donc pas été testés en diffraction¹⁰⁴ (Figure 31).

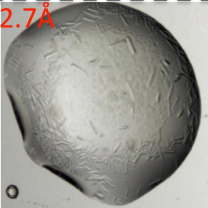
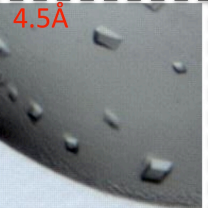
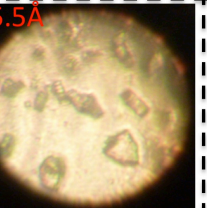

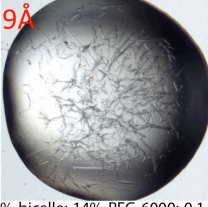
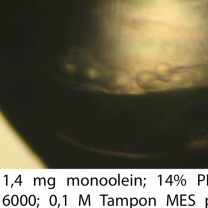
Méthode de cristallisation	Porine			
	Omp-Pst1-ATCC	Omp-Pst1-99645	Omp-Pst1-Nea16	Omp-Pst2-ATCC
Méthode classique en présence du détergent	 14% PEG 6000; 0,1 M Tampon MES pH 6,5; 0,1 M MgCl ₂	 14% PEG 6000; 0,1 M Tampon MES pH 6,5; 0,1 M MgCl ₂ ampicilline	 14% PEG 6000; 0,1 M Tampon MES pH 6,5; 0,1 M MgCl ₂ 5% sucrose	 8% PEG 6000; 0,1 M Tampon Tris pH 8; 1 M Lithium chloride
Méthode Bicelle	 8% bicelle; 14% PEG 6000; 0,1 M Tampon MES pH 6,5; 0,1 M MgCl ₂			
Méthode <i>in méso</i> (Phase lipidique cubique)	 1,4 mg monoolein; 14% PEG 6000; 0,1 M Tampon MES pH 6,5; 0,1 M MgCl ₂			

Figure 31: Classification des différents cristaux de porines de *P. stuartii* obtenus en fonction de la méthode de cristallisation utilisée. Les porines générales de *P. stuartii* ont cristallisé dans trois méthodes différentes. La méthode classique en présence du détergent, la méthode bicelle et la méthode de phase lipidique cubique. Les différentes conditions de cristallisation, ainsi que la diffraction obtenue sur ces cristaux, sont illustrées ci-dessus. Les cristaux qui ont poussé en phase lipidique cubique n'ont pas pu être testés par diffraction.

I-2.2: Méthodes de co-cristallisation et de trempage

En vue de caractériser la structure de putatifs complexes entre les porines et divers ligands, nous avons procédé à des co-cristallisations et à des trempages de cristaux. Dans la première approche, les ligands d'intérêt sont mélangés avec la protéine à des concentrations variables, avant la mise en place des essais de cristallisation. Nous avons ainsi testé différents sucres (sucrose, maltose, lactose et tréhalose) et différents antibiotiques (ertapénème, ampicilline, imipénème, céfepime, céfoxitine, rifampicine et vancomycine). Les concentrations en ligands étaient comprises entre 1 et 100 mM pour les antibiotiques et 1 et 25 mM pour les sucres. Pour nos expériences de trempage, les cristaux ont été transférés dans des solutions de liqueur mère supplémentées par des concentrations variables de ligands (0.01 à 0.25 M) pendant une période allant de 30 s à 2 h. Malgré ces multiples essais, nous n'avons pu obtenir la structure d'un complexe que pour le maltose et par co-cristallisation. La structure du complexe a été résolue à 3 Å de résolution.

I-3: Collecte et traitements des données cristallographiques au synchrotron

Les collectes de données ont été réalisées à l'ESRF. Avant les collectes de données, tous les cristaux furent cryoprotégés par trempage dans une solution de cryo-protection (liqueur mère + 18 % de glycérol) pour une durée allant de 30 s à 1 min, puis refroidis de façon ultra rapide soit par une plongée dans l'azote liquide, soit par introduction directe dans un flux d'azote gazeux à 100 K. La cryoprotection permet de minimiser les dommages d'irradiation aux rayons X et ainsi, de maximiser la durée de vie des cristaux. Au cours de cette étude, nous avons testé différents cryo-protectants : l'éthylène glycol, des sucres (sucrose, glucose), différents PEG (polyéthylène-glycol) de bas poids moléculaire, le MPD (2-méthyl 2,4-pentanediol) et le glycérol ¹²². Au vu de la diffraction, il est apparu clairement que le glycérol à 18% offrait une cryoprotection idéale (Figure 32).

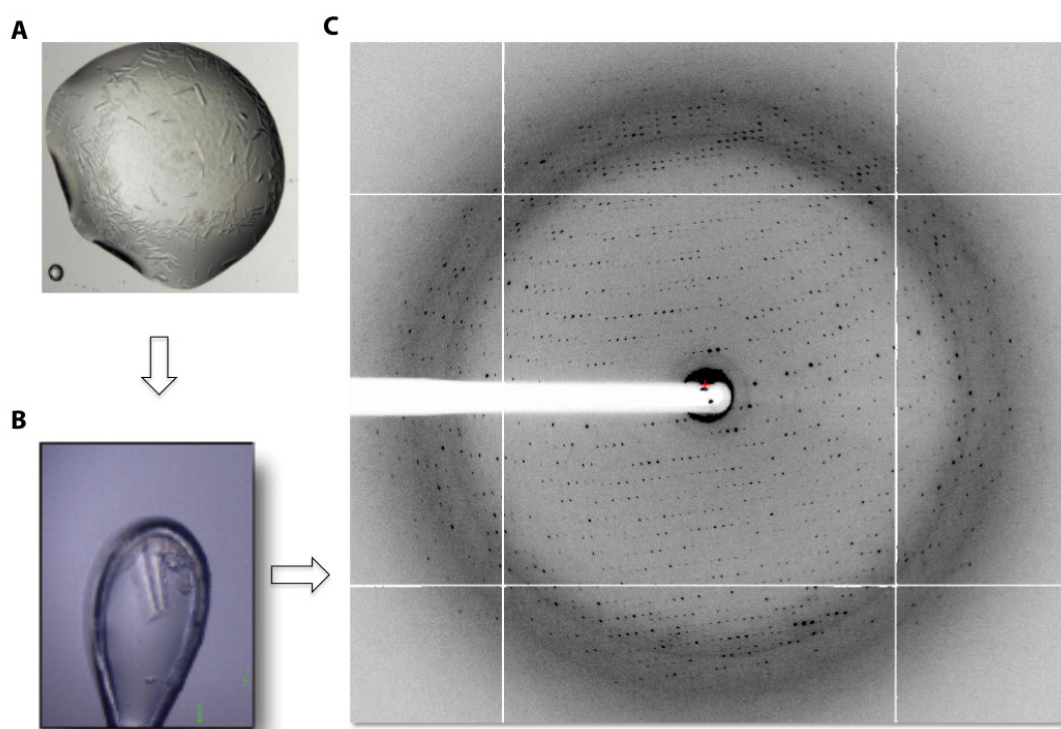


Figure 32: Collecte de données cristallographiques sur les cristaux d'Omp-Pst1-ATCC. A/ Les cristaux d'Omp-Pst1 ont poussé dans une goutte assise par diffusion de vapeur. B/ Ces cristaux sont montés au sein d'une boucle en nylon (Hampton) après les avoir cryo-protégés en présence de glycérol à 18%. C/ La collecte de données est effectuée sur ID23EH1 à l'ESRF. Le cliché de diffraction obtenu présente des taches jusqu'à 2,7 Å de résolution.

Omp-Pst1-ATCC a pu être cristallisé dans deux groupes d'espace différents, orthorhombique primitif ($P2_12_12_1$) et monoclinique centré ($C2$). Historiquement, nous avons obtenu la forme orthorhombique en premier, et c'est dans ce groupe d'espace (forme A) que nous avons non

seulement obtenu la structure native d'Omp-Pst1-ATCC à la plus haute résolution mais aussi du complexe d'Omp-Pst1-ATCC avec le maltose. La forme monoclinique (forme B) a été obtenue en co-cristallisant Omp-Pst1-ATCC en présence de vancomycine, quoique qu'aucune densité électronique n'ait été observée pour cet antibiotique. Les deux variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques ont également cristallisé dans un groupe d'espace monoclinique centré (C2). Omp-Pst2-ATCC, cependant, a cristallisé dans un groupe d'espace monoclinique primitif (P2₁). Concernant les différentes structures d'Omp-Pst1-ATCC (monoclinique ou orthorhombique, native ou en complexe), l'examen de leur facteur B de Wilson, qui reflète l'agitation thermique au sein du cristal, montre que la présence du maltose dans le complexe induit un désordre, probablement lié à son interaction avec la porine (Figure 33).

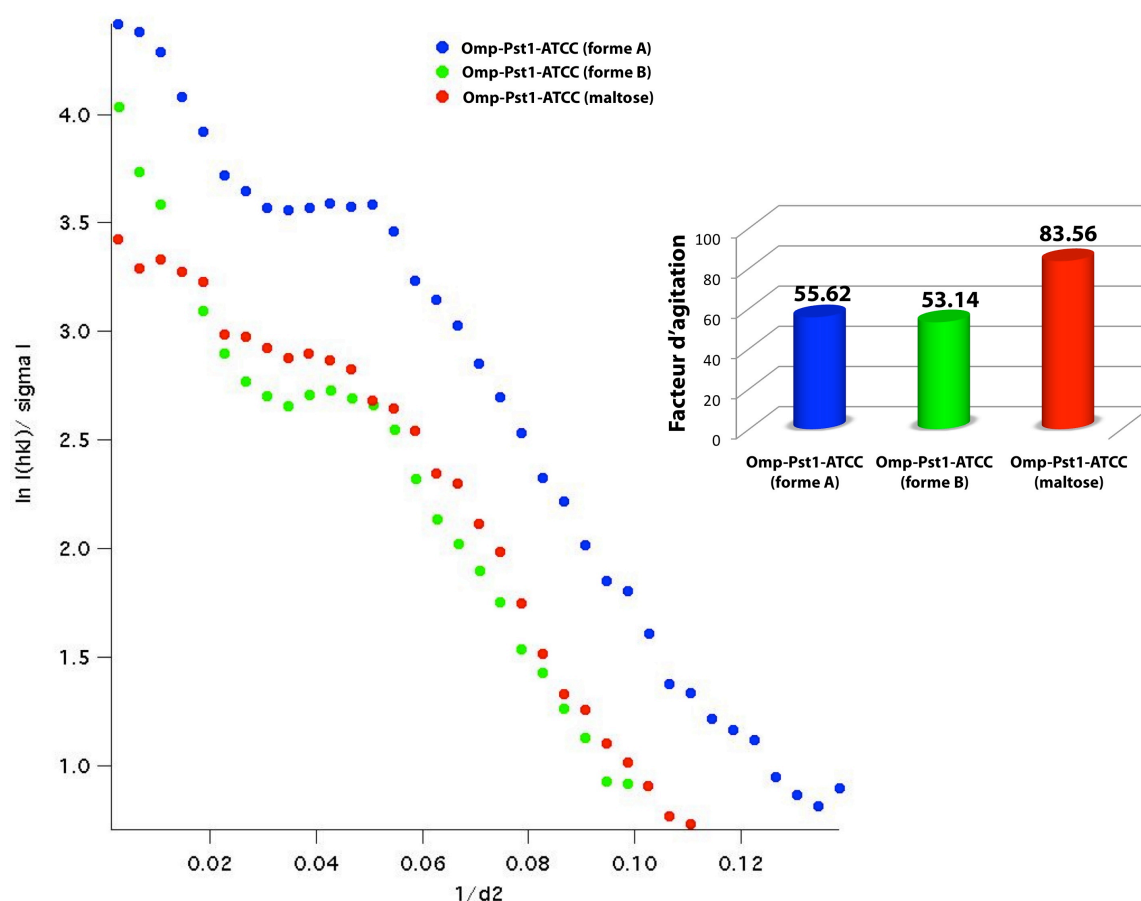


Figure 33: Représentation de Wilson des structures cristallographiques d'Omp-Pst1 résolues en absence et en présence d'un ligand. Les facteurs d'agitation représentés dans l'histogramme pour chacune des structures, Omp-Pst1-ATCC (forme A), Omp-Pst1-ATCC (forme B) et Omp-Pst1-ATCC (maltose) ont été déterminés à partir de la pente de leur courbes de Wilson respectives dans une gamme de résolution située entre 3.5 Å et la limite haute de résolution de chacune.

Toutes les structures ont été phasées par remplacement moléculaire. Comme déjà introduit dans le chapitre méthodologie, cette méthode consiste à orienter et positionner une structure homologue dans la maille cristalline, grâce à laquelle une première carte de densité

électronique est obtenue. Le modèle atomique est ensuite modifié et affiné manuellement dans l'espace réel, et informatiquement dans l'espace réciproque. Pour phaser la première structure d'Omp-Pst1-ATCC (forme A), nous avons généré un modèle grâce au programme MODELLER¹¹⁴ en utilisant comme structure de départ la porine OmpF d'*E. coli*. Celui-ci a ensuite été fourni au programme PHASER¹⁰⁵ qui a réalisé le remplacement moléculaire. Dans la maille, on ne trouve qu'un seul trimère d'Omp-Pst1-ATCC, ce qui correspond à un pourcentage de solvant de 75%. Pour phaser la structure d'Omp-Pst2-ATCC ainsi que celles des variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques, MODELLER a également été utilisé pour générer les modèles homologues, mais en se basant sur la structure alors déjà résolue d'Omp-Pst1-ATCC plutôt que sur celle d'OmpF. Dans tous les cas, les pourcentages de solvant sont supérieurs ou égaux à 75% dans nos structures.

Dans toutes les structures appartenant à un groupe d'espace monoclinique ($P2_1$ ou $C2$), des contacts sont observés entre les boucles externes des porines. Dans les structures d'Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst2-ATCC, ces contacts sont symétriques et en face à face, *i.e.* entre des segments identiques des boucles externes des porines. Notons que la structure d'Omp-Pst1-ATCC obtenue dans le groupe d'espace orthorhombique (c'est à dire celle qui ne présente pas de contact entre boucles externes) est surprenante en ce que quasiment aucun contact interprotéique n'est observé ; ce sont plutôt les molécules de détergent qui semblent médier les contacts cristallins, une observation pour le moins inattendue (Figure 34).

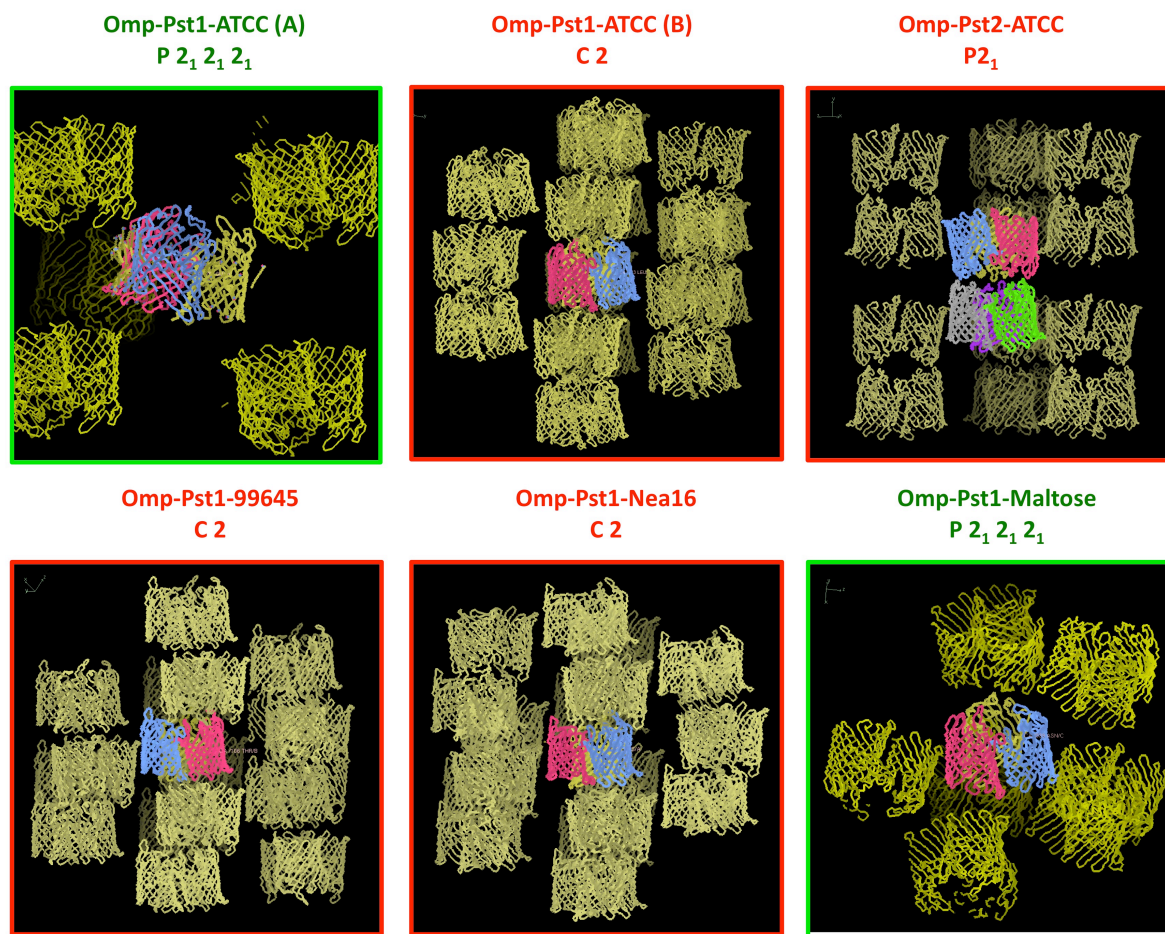


Figure 34: Empilement cristallin obtenu au sein des cristaux des différentes porines générales de *P. stuartii*. L'unité asymétrique est distinguée grâce à une coloration multicolore. Omp-Pst2 possède deux 2 trimères dans l'unité asymétrique contrairement au autres porines représentées où un seul trimère est présent dans l'unité asymétrique.

Les paramètres cristallographiques et les statistiques d'intégration des données pour les différentes structures résolues sont présentées dans le tableau 4.

	Omp-Pst1-ATCC (A)	Omp-Pst1-ATCC (B)	Omp-Pst2-ATCC
Ligne de lumière	ESRF ID23-EH1	ESRF ID14-EH4	ESRF ID14-EH4
Longueur d'onde du faisceau X (Å)	0.87	0.93	0.93
Résolution (Å)	38.79 - 2.7 (2.796 - 2.7)	36.25 - 3.2 (3.314 - 3.2)	46.49 - 2.2 (2.279 - 2.2)
Groupe d'espace	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	C 2	P 2 ₁
Paramètres de maille a, b, c (Å) α, β, γ (°)	108.84 129 159.52 90 90 90	151.52 142.02 90 131 90	143.26 135.54 151.76 90 114.6 90
Nombre de reflexions uniques	59296 (5812)	27279 (2796)	258792 (22726)
Completude (%)	95.16 (94.55)	91.19 (93.39)	97.05 (85.46)
Facteur de température B (wilson)	55.62	53.14	34.43
Quantité de solvant (%)	73.66	67.94	77.98
I/sigma(I)	17.46 (2.33)	11.20 (2.65)	10.87 (1.87)

Les données entre parenthèse correspondent à la couche de plus haute résolution

	Omp-Pst1-99645	Omp-Pst1-NEA16	Omp-Pst1-Maltose
Ligne de lumière	ESRF ID14-EH4	ESRF ID14-EH4	ESRF ID23-2-EH2
Longueur d'onde du faisceau X (Å)	0.93	0.93	0.87
Résolution (Å)	44.34 - 4.0 (4.143 - 4.0)	45.85 - 5.5 (5.696 - 5.5)	39.41 - 3.0 (3.107 - 3.0)
Groupe d'espace	C 2	C 2	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètres de maille a, b, c (Å) α, β, γ (°)	131.17 155.83 111.26 90 127.16 90	141.78 151.13 109.07 90 125.54 90	104.2 127.12 150.72 90 90 90
Nombre de reflexions uniques	14996 (1489)	5957 (577)	40610 (4025)
Completude (%)	99.17 (99.13)	97.00 (96.81)	99.62 (99.95)
Facteur de température B (wilson)	108.31	90.11	82.56
Quantité de solvant (%)	67.45	68.97	70.45
I/sigma(I)	9.75 (2.65)	7.20 (2.34)	10.60 (2.16)

Les données entre parenthèse correspondent à la couche de plus haute résolution

Tableau 4: Résumé des paramètres cristallographiques et des statistiques d'intégration des données pour les différentes structures de porines résolues.

I-3.1: Affinement des structures

Nous avons utilisé plusieurs programmes dans les stages initiaux de l'affinement de la structure d'Omp-Pst1-ATCC dans le groupe d'espace orthorhombique. Parmi eux, c'est PHENIX ¹¹⁰ qui a permis d'obtenir les meilleures structures en terme de R_{fac} et R_{free} . De fait, c'est ce programme qui a été utilisé pour affiner la plupart des structures décrites dans ce manuscrit. Seules les structures à très basses résolutions ont été affinées en utilisant REFMAC5 ¹¹⁶. L'affinement cristallographique se fait avec une fonction objective qui maximise le «maximum likelihood» de la structure obtenue, *i.e.* sa vraisemblance au regard de la quantité et la qualité des données, de leur accord entre la structure et du savoir préexistant sur les longueurs de liaisons, angles et atomes, etc. Pour les structures à basse résolution, pour lesquelles nous n'avons donc mesuré que peu d'observations (taches de diffraction), nous avons dû faire un compromis sur le nombre de paramètres à affiner.

En résumé, pour les structures présentant une résolution meilleure ou égale à 3.5 Å (Omp-Pst1-ATCC (A), Omp-Pst1-ATCC (B), Omp-Pst1-Maltose et Omp-Pst2-ATCC), nous avons affiné les positions de chaque atome (x, y, z), ainsi que leur facteur B individuel. Nous avons également affiné les paramètres TLS de la molécule (déterminé sur wwTLSMD), lesquels rendent compte de mouvements collectifs d'atomes dans le cristal. L'utilisation de la TLS dans l'affinement permet de distinguer les désordres résultant de mouvements collectifs d'atomes de ceux résultant de mouvements individuels, lesquels sont sinon convolués dans la valeur du facteur B. Nous avons par ailleurs imposé des restreintes (mais pas de contraintes) entre atomes équivalents dans chacun des monomères du trimère (ou du dimère de trimère). Cette stratégie d'affinement, et plusieurs cycles de reconstruction manuelle dans Coot ¹¹⁵, ont permis d'obtenir des structures interprétables et de bonne qualité pour les résolutions considérées.

Pour les structures d'Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16 que nous avons résolu à 4.5 et 5.5 Å de résolution, respectivement, notre approche d'affinement a été différente. D'abord, nous avons utilisé des restreintes plus fortes entre atomes équivalents dans chacun des monomères du trimère. Nous avons également utilisé des restreintes sur les structures secondaires, ce qui a permis de maintenir stable le tonneau beta. Nous avons enfin utilisé des B-facteurs groupés, *i.e.* un seul B facteur par résidu, et avons pris avantage de l'approche de « Jelly body refinement » ¹¹⁶ qui impose des restreintes sur les variations de distances interatomiques non covalentes. Cette stratégie permet d'éviter un dépliement partiel de la protéine, ce qui est

commun lorsque l'on affine un modèle protéique avec ses chaînes latérales à basse résolution. La figure 35 illustre notre succès avec cette stratégie d'affinement sur Omp-Pst1-99645.

Au cours de l'affinement, les facteurs de structure observés et calculés doivent converger. En d'autres termes leur écart, mesuré par le facteur R, doit diminuer. Afin d'éviter un sur-affinement des données, on utilise également un facteur R_{libre} , ou R_{free} , qui est calculé sur un faible pourcentage de réflexions (5% en général) qui ne sont pas incluses dans l'affinement. L'écart entre R_{fac} et R_{free} est variable selon la résolution et généralement plus élevé à basse résolution qu'à haute résolution, mais se situe en général entre 3 et 7 %. Nous notons que nos différentes structures se positionnent très bien en termes de statistiques (RMSD sur les liaisons et les angles, le R_{free} , le R_{fac} et le facteur B) lorsqu'on les compare aux structures de la Protein Data Bank (wwPDB) résolues à des résolutions comparables. Les statistiques d'affinement ainsi que les indicateurs témoignant de la bonne géométrie de nos modèles sont présentées dans le tableau 5.

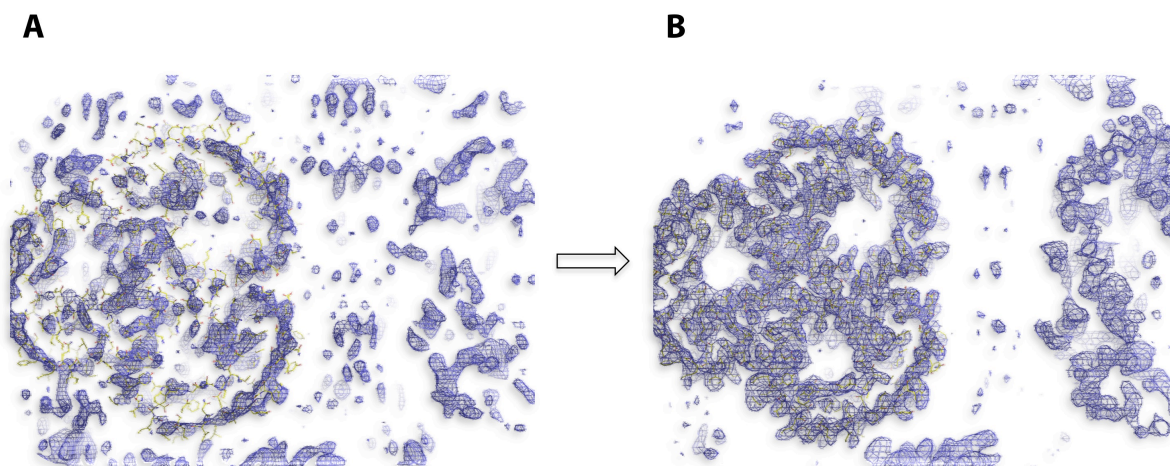


Figure 35: Stratégie d'affinement employée pour Omp-Pst1-99645. La carte de densité électronique (2Fo-Fc) d'Omp-Pst1-99645 à 1 sigma est représentée au départ (A) et à la fin de l'affinement (B). Le modèle protéique d'Omp-Pst1-99645 est également représenté au sein de la carte. L'approche d'affinement employée consiste à appliquer des contraintes fortes entre atomes équivalents dans chacun des monomères du trimère, ainsi que sur les structures secondaires maintenant stable le tonneau beta. De même les facteurs B groupés (un seul B facteur par résidu) ont été considérés à la place de celles individuels (pour chaque atome). Enfin, l'approche « Jelly body refinement », implémentée dans REFMAC5 a été également utilisée.

	Omp-Pst1-ATCC (A)	Omp-Pst1-ATCC (B)	Omp-Pst2-ATCC
Résolution (Å)	38.79 - 2.7 (2.796 - 2.7)	36.25 - 3.2 (3.314 - 3.2)	46.49 - 2.2 (2.279 - 2.2)
R_{fact}	0.2338 (0.4542)	0.2075 (0.3030)	0.1944 (0.3050)
R_{free}	0.2854 (0.4984)	0.2611 (0.3835)	0.2231 (0.3336)
Rmsd moyen des liaisons (Å)	0.02	0.006	0.029
Rmsd moyen des angles (°)	2	1.01	2.12
Contenu de l'unité asymétrique:			
Nombre de trimère	1	1	2
Nombre de résidus	1056	1056	2058
Nombre d'atomes	8315	8298	16202
Facteur de température moyen 	74.5	76	38.8
Ramachandran:			
Residus dans la région favorable(%)	94	93	95
Residus dans la région aberrante(%)	0.19	0.38	0.44

Les données entre parenthèse correspondent à la couche de plus haute résolution

	Omp-Pst1-99645	Omp-Pst1-NEA16	Omp-Pst1-Maltose
Résolution (Å)	44.34 - 4.0 (4.143 - 4.0)	45.85 - 5.5 (5.696 - 5.5)	39.41 - 3.0 (3.107 - 3.0)
R_{fact}	0.2222 (0.2915)	0.3311 (0.3399)	0.2191 (0.3116)
R_{free}	0.3136 (0.4185)	0.3696 (0.3345)	0.2662 (0.3573)
Rmsd moyen des liaisons (Å)	0.012	0.012	0.012
Rmsd moyen des angles (°)	1.61	1.52	1.83
Contenu de l'unité asymétrique:			
Nombre de trimère	1	1	1
Nombre de résidus	1047	1047	1059
Nombre d'atomes	8280	8208	8264
Facteur de température moyen 	149.2	162.6	92.6
Ramachandran:			
Residus dans la région favorable(%)	68	78	93
Residus dans la région aberrante(%)	11	3.9	1.5

Les données entre parenthèse correspondent à la couche de plus haute résolution

Tableau 5: Résumé des paramètres cristallographiques et des statistiques d'affinement pour les différentes structures de porines résolues.

I-4: Analyse structurale des porines de *P. stuartii*

Dans cette partie, nous allons décrire les structures des porines de *P. stuartii* en soulignant, le cas échéant, les différences majeures avec les porines homologues d'*E. coli*. Dans ce cadre, nous comparerons Omp-Pst1 à OmpF et Omp-Pst2 à OmpC sur la base du pourcentage d'homologie entre leurs séquences (49.1 et 56%, respectivement). Nous excluons

délibérément PhoE de ce calcul car cette porine n'est exprimée qu'en condition de carence en phosphate et non pas constitutionnellement comme OmpF et Omp-Pst1. Nous décrirons également les structures résolues à basse résolution des variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques, nommément Omp-Pst1-Nea16 et Omp-Pst1-99645. Nous décrirons par ailleurs la structure du complexe formé entre Omp-Pst1-ATCC et le maltose, fournissant ainsi une base structurale à un possible rôle de cette porine dans le transport des sucres.

I-4.1: Architecture générale des porines de *P. stuartii*

Les porines de *P. stuartii* présentent l'architecture conservée des porines non spécifiques, à savoir un tonneau β constitué de 16 brins, 8 boucles extracellulaires (L1-L8) et 8 coudes périplasmiques plus courts (T1-T8) (Figure 36 A, B). Le repliement de la boucle L3 dans le canal impose une zone de constriction à mi-hauteur (Figure 36 C). Avec la région du tonneau beta qui lui fait face, nommée région anti-L3, la région L3 détermine la sélectivité ionique (positive ou négative) et stérique des porines (600 Da)¹²³. Au sein du tonneau, les feuilletts β sont inclinés de 20 à 45° par rapport à la normale de la membrane. Comme la plupart des porines non spécifiques, Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont exprimées sous la forme de trimères associés par leur boucle L2 grâce en particulier à deux résidus conservés: W62 et N75 chez Omp-Pst1, et W59 et N72 chez Omp-Pst2 (Figure 36 D).

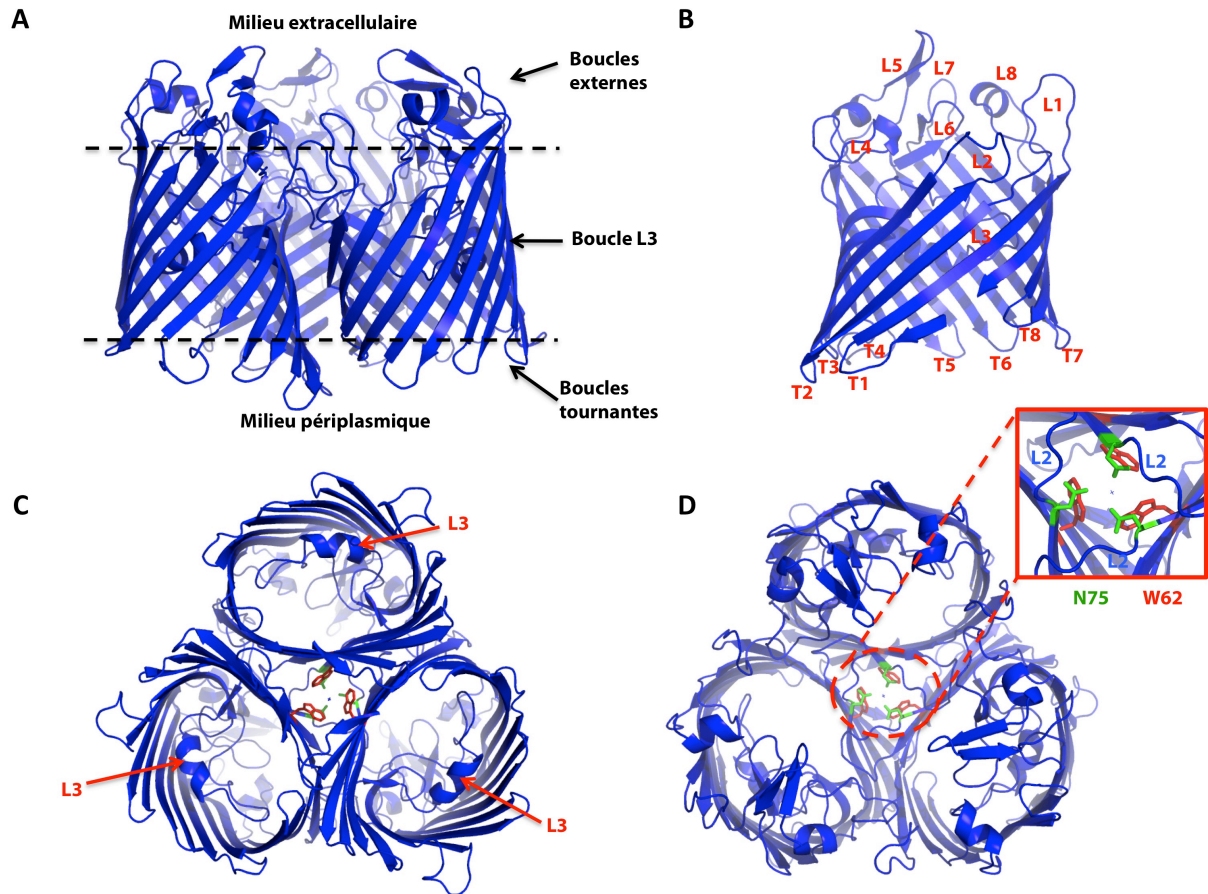


Figure 36: Architecture générale d'Omp-Pst1, la porine majoritaire chez *Providencia stuartii*. A/ Diagramme en ruban, représentant la structure tridimensionnelle d'un trimère d'Omp-Pst1-ATCC (coloré en bleu), vu le long de la membrane. Cette structure est représentée au sein de la membrane externe. B/ Vue latérale d'un seul monomère d'Omp-Pst1-ATCC. La localisation des boucles externes ainsi que des tournants internes est représentée par les lettres L (Loop) et T (Turns), respectivement C-D/ Diagramme en ruban, représentant la structure du trimère d'Omp-Pst1-ATCC, vue du côté extracellulaire (C) et périplasmique (D). Les boucles L3 et L2 ainsi que les résidus W62 et N75 sont, de même, indiquées.

I-4.2: Analyse de la stabilité du trimère

Une des surprises majeures lors de la résolution des structures d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2, fut l'observation d'un canal allant de l'espace périplasmique jusqu'à la zone d'interaction entre monomères dans le trimère, juste en-dessous des résidus W62 et N75 chez Omp-Pst1, et W59 et N72 chez Omp-Pst2, respectivement (Figure 37 A). Ce quatrième canal, très étroit, n'est ouvert que du côté périplasmique. Entre les trois monomères nous observons un pic de densité électronique positif dans les cartes de densité ($F_o - F_c$) initiales. Le pic est au mieux modélisé par un ion Mg^{2+} . Celui-ci, assis entre les chaînes aromatiques des résidus W62/59, pourrait aider à stabiliser les trois monomères par des interactions de type cation- π (Figure 37 B). Pour investiguer la possible spécificité de ce site pour les ions Mg^{2+} , nous le remplaçons par différents cations divalents (Figure 37 C). Nos gels suggèrent que les ions Mg^{2+} , Mn^{2+} et Ca^{2+} peuvent interagir à ce site sans entraîner la dissociation du trimère en monomère, contrairement aux ions Zn^{2+} et Fe^{2+} qui entraînent la dissociation du trimère en

monomère. Le Ni^{2+} , quant à lui, entraîne la formation de deux espèces monomériques distinctes, correspondant à des versions plus ou moins dénaturées. À ce stade, il reste cependant difficile de conclure sur un possible rôle physiologique à ce site dans la fixation ou le « sensing » des cations divalents.

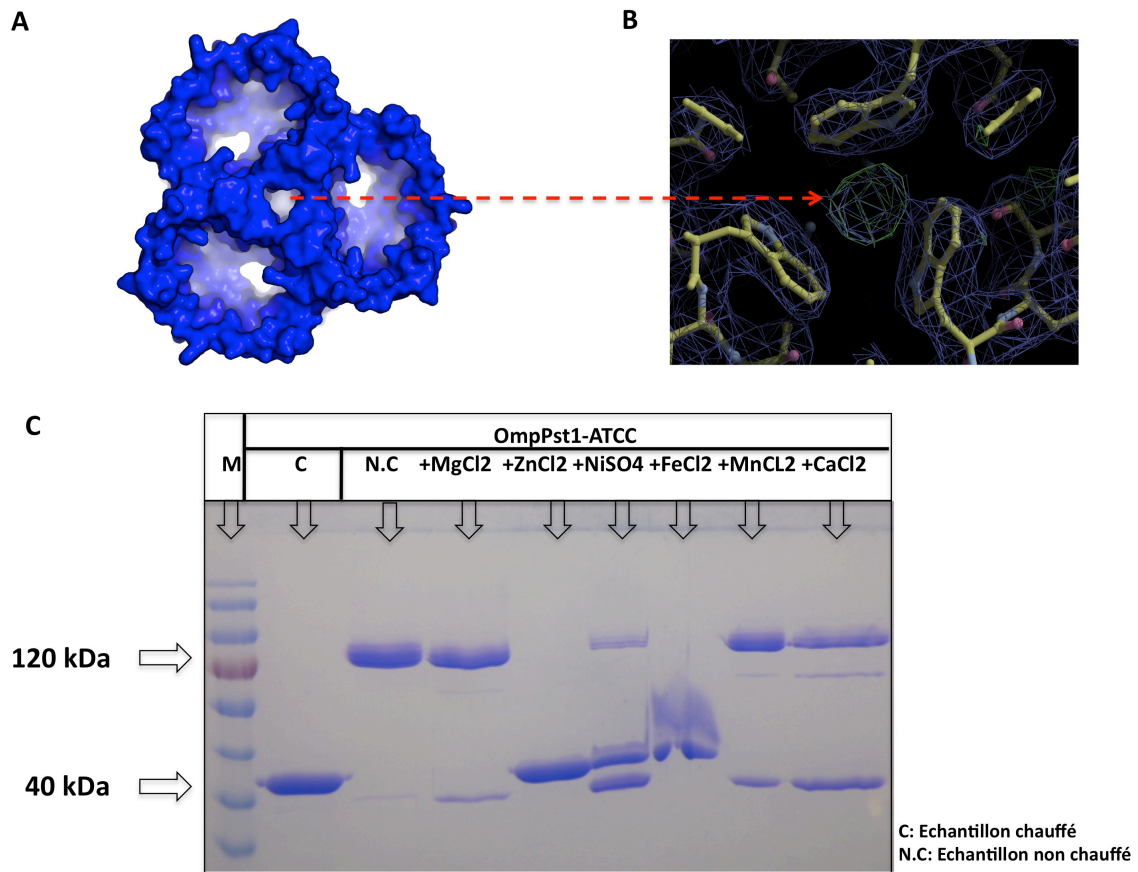


Figure 37: Caractérisation structurale de la stabilité du trimère au sein des porines. A/ La structure tridimensionnelle d'Omp-Pst1-ATCC est représentée en mode surface, vue du côté périplasmique. B/ La carte électronique de différence (Fo-Fc) à 3 sigma montre une densité positive (verte) au milieu de trois résidus tryptophanes W62 qui appartiennent aux trois monomères du trimère d'Omp-Pst1, respectivement. Connaissant les conditions de cristallisation dans lesquelles ces cristaux ont poussé, nous attribuons cette densité à un ion Mg^{2+} . C/ Le gel SDS 10% polyacrylamide, est coloré avec du bleu de Coomassie. Il montre une migration des porines d'Omp-Pst1-ATCC à 120 kDa (taille d'un trimère), en absence de chauffage à 90°C et à 40 kDa (taille d'un monomère), après chauffage à 90°C. Les différents ions divalents sont mis en incubation avec Omp-Pst1 (échantillon non chauffé), pendant 30 min, avant la migration sur gel.

I-4.3: Variabilité des boucles externes des porines

Afin de caractériser les changements structuraux majeurs entre les porines de la forme sauvage de *P. stuartii*, Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst2-ATCC, et leurs homologues respectifs chez *E. coli*, OmpF et OmpC, nous avons entrepris la caractérisation de leurs structures cristallographiques. Nous avons ainsi pu identifier une variabilité de séquence marquée, en particulier au niveau de leurs boucles externes (Annexe 1).

La comparaison entre Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst2-ATCC révèle chez la dernière une insertion dans sa boucle L6 (254-DD-255), et des délétions dans ses boucles L5 (206-GVVTSEGDSSYY-216) et L1 (30-KKS-32) (Figure 38 A). De façon similaire, la comparaison d'Omp-Pst1 avec son homologue OmpF montre que cette dernière présente des insertions en L2 (69-SEG-72) et L6 (254-NKFT-257), et des délétions en L4 (163-KSSAGM-16) et L5 (211-EGDSYYSAT-219) (Figure 38 B). Chez OmpC, qui se compare plus justement avec Omp-Pst2, les différences structurales se situent surtout dans la boucle L4, où l'on voit une insertion du fragment 163-GEGFTSGV-170, et dans la boucle L6 où le fragment 254-DDD-256 est déléte (Figure 38 C). Tous ces changements structuraux moduleront la taille ainsi que la spécificité de ces boucles. Dans ce contexte, il est intéressant de mentionner que le fragment peptidique 166-GEGFTSGV-168, présent au sein de la boucle L4 d'OmpC, et qui est déléte chez Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst2-ATCC, a été reconnu comme un site antigénique dans les travaux de Simonet et *al*¹²⁴.

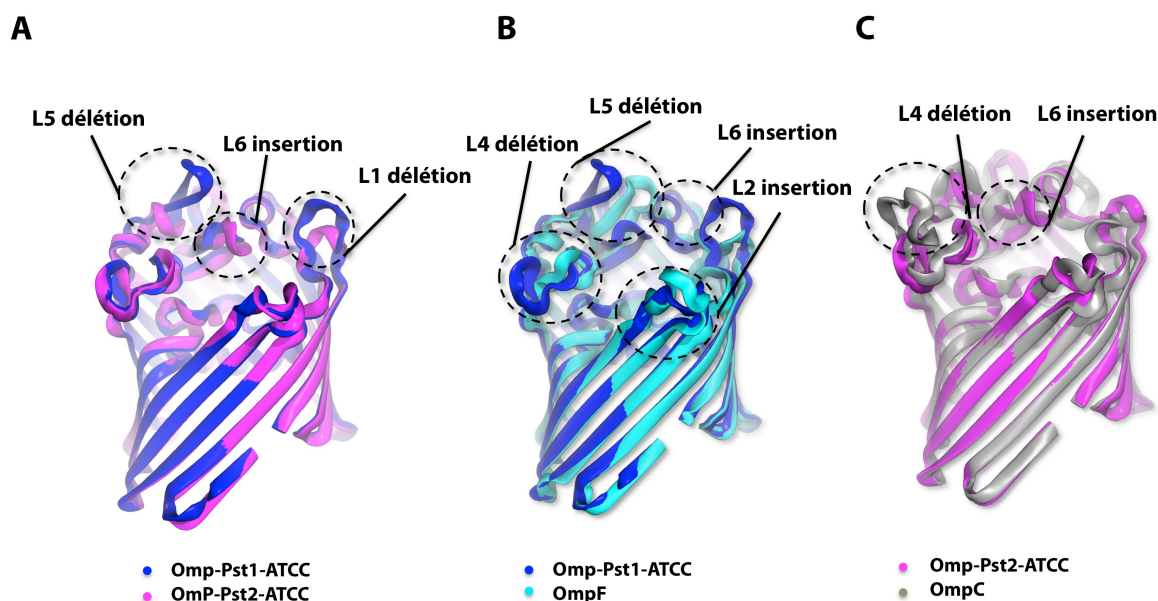


Figure 38: Changements conformationnels majeurs entre les porines de *P. stuartii* et leurs homologues de chez *E. coli*. A-C/ Vues latérales de la superposition de deux monomères : Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst2-ATCC (A) ; Omp-Pst1 et OmpF (B) ; Omp-Pst2 et OmpC (C), vus le long de la membrane.

De façon similaire, nous avons caractérisé les changements structuraux majeurs entre la forme sauvage d'Omp-Pst1 et celles exprimées par deux isolats cliniques (Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16) en se basant sur leurs structures cristallographiques. Celle-ci n'a eu qu'un succès mitigé, puisque nous ne rapportons la résolution de ces structures qu'à 4.5 et 5.5 Å de résolution, respectivement. L'utilisation de méthodes d'affinement adaptées à la basse

résolution, ainsi que la proximité de séquence entre les différentes variantes d'Omp-Pst1, nous ont permis cependant d'aboutir à des modèles convenables pour Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16. Les deux variantes illustrent un consensus dans l'adaptation de *P. stuartii* « *in situ* ». En effet, les deux subissent une délétion de taille similaire dans la boucle L5 (204-KAGVVTSEG-212), et une insertion de résidus dans la boucle L7 (293-RTYNGKT-299) (Figure 39). De même, les mutations K221Q, D290N et K334R des boucles L5, L7 et L8, respectivement, sont conservées auprès des deux mutants (Annexe 2). Il est intéressant de noter que la délétion en L5 concerne le motif « β -hairpin », impliqué dans la dimérisation d'Omp-Pst1 en hexamère, alors que l'insertion concerne la boucle L7 impliquée dans la dimérisation d'Omp-Pst2. Sachant que les structures en « β -hairpin » peuvent servir d'épitopes aisément reconnaissables par le système immunitaire, il est possible que la délétion en L5 fasse suite à une volonté de camouflage de ses porines par *P. stuartii* ¹²⁵. Cela signifierait que les deux mutants empruntent le même chemin évolutif chez les parents, quoique ces deux souches cliniques de *P. stuartii* aient été reconnues d'origine clonale différente ⁶².

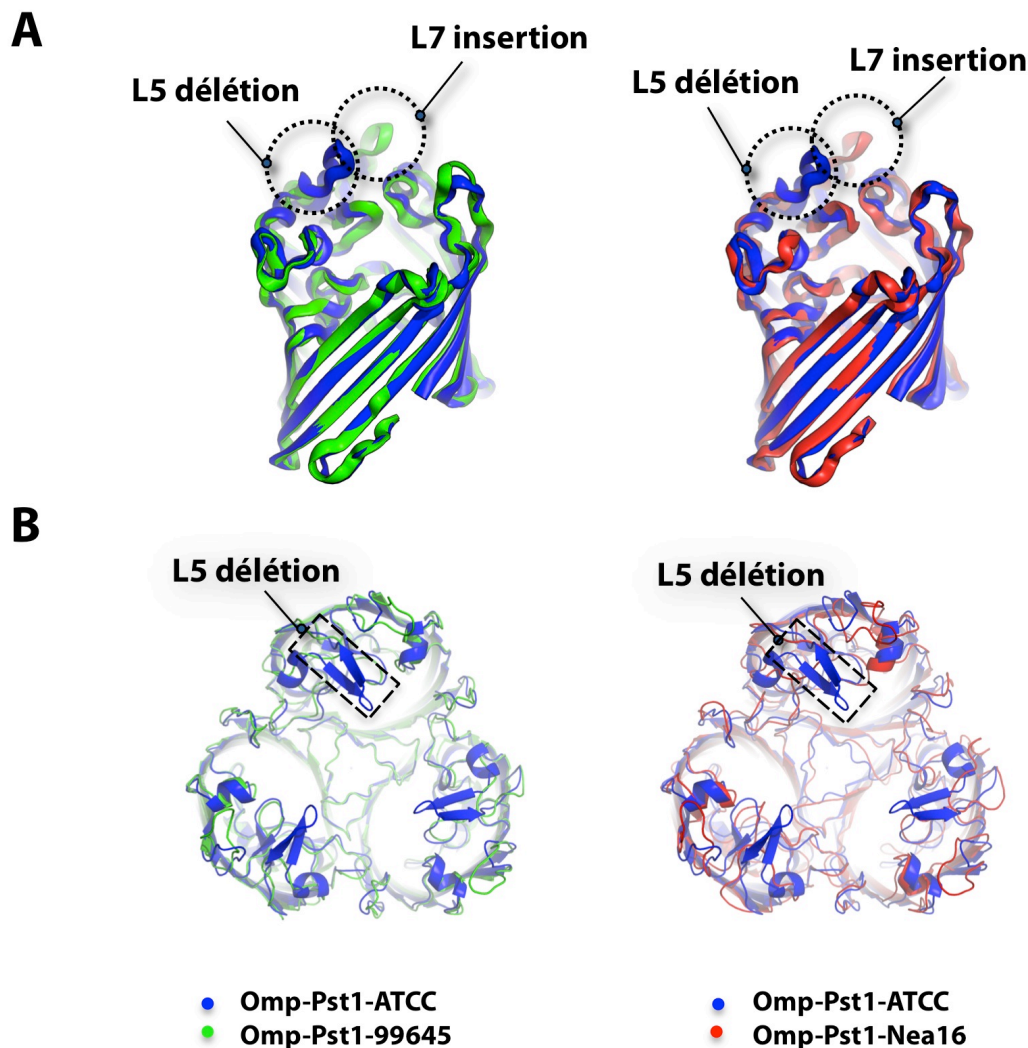


Figure 39: Changements conformationnels majeurs au sein des variantes d'Omp-Pst1. A/ Vues latérales de la superposition de deux monomères de porines. La superposition concerne: Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst1-99645 (à gauche), Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst1-Nea16 (à droite). B/ Vues extracellulaires de la superposition des structures trimériques de porines susmentionnées. La délétion du motif « β -hairpin » 204-KAGVVTSEG-212 de la boucle L5 au sein des deux variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques est localisée dans les quadrants en pointillés noirs.

I-4.4: Analyse du champ électrostatique développé au sein des porines

Dans un deuxième temps, nous avons modélisé le champ électrostatique développé au sein des porines, grâce au logiciel APBS¹²⁶. Ce logiciel calcule une solution numérique pour des équations de Poisson-Boltzmann qui permettent de modéliser la distribution des charges à la surface d'une molécule et de visualiser la valeur du potentiel électrostatique sur cette surface.

La représentation en surfaces des isopotentiels électrostatiques développés du côté extracellulaire par nos différentes porines montre un champ électrostatique positif fort sur le

pourtour des porines de *P. stuartii* (Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst2-ATCC) alors que celui développé pour les porines d'*E. coli* (OmpF et OmpC) l'est beaucoup moins (Figure 40). À l'entrée des canaux cependant, les porines de *P. stuartii* et d'*E. coli* se ressemblent fort, puisque c'est un champ électrostatique négatif qui les domine toutes, à l'exception possible d'OmpF qui montre un caractère zwitterionique.

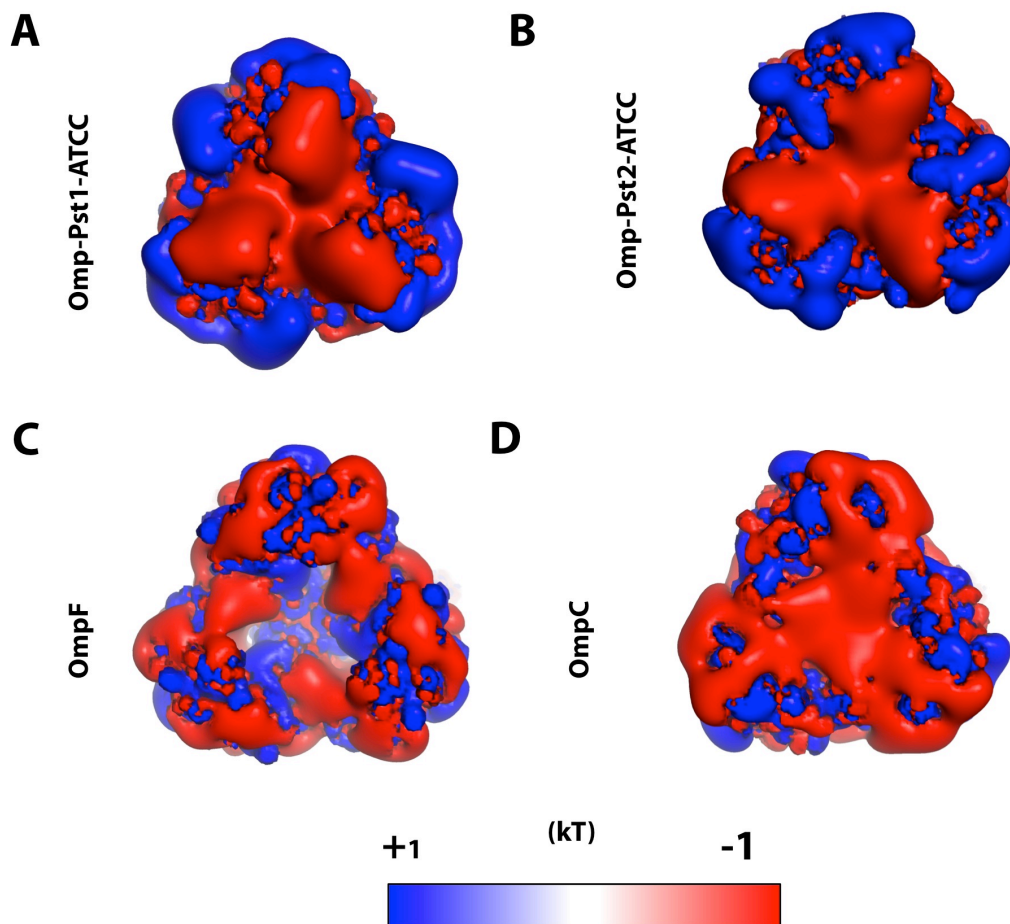


Figure 40: Représentation des surfaces d'isopotentiels électrostatiques développées au sein des porines. A-D/ Le champ électrostatique développé au sein des porines est modélisé avec le logiciel APBS, après protonation à pH 7, grâce au logiciel PDB2PQR/PROPKA et en présence de 150 mM NaCl. Les structures d'Omp-Pst1-ATCC (A), Omp-Pst2-ATCC (B), OmpF (C) et OmpC (D) sont représentées, vues du côté extracellulaire. Les charges négatives sont colorées en rouge et les charges positives en bleu. L'échelle du potentiel électrostatique illustré est en K_bT (K_b : Constante de Boltzmann; T: Température).

Chez les variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques, Omp-Pst1-996456 et Omp-Pst1-Nea16, nous avons identifié une augmentation du champ électrostatique positif sur leurs pourtours, en comparaison de la forme sauvage. En addition, le champ électrostatique développé à l'entrée de leurs canaux est zwitterionique, et non plus négatif (Figure 41 A). Cette observation structurale pourra expliquer pourquoi ces deux mutants interagissent si fortement avec les molécules de LPS, comme nous l'avons montré précédemment par notre gel SDS Page (Figure 41 B). Une telle observation est réminiscente du cas de FhuA dont la structure a été résolue en complexe avec une molécule de LPS ¹¹ (Figure 41 C).

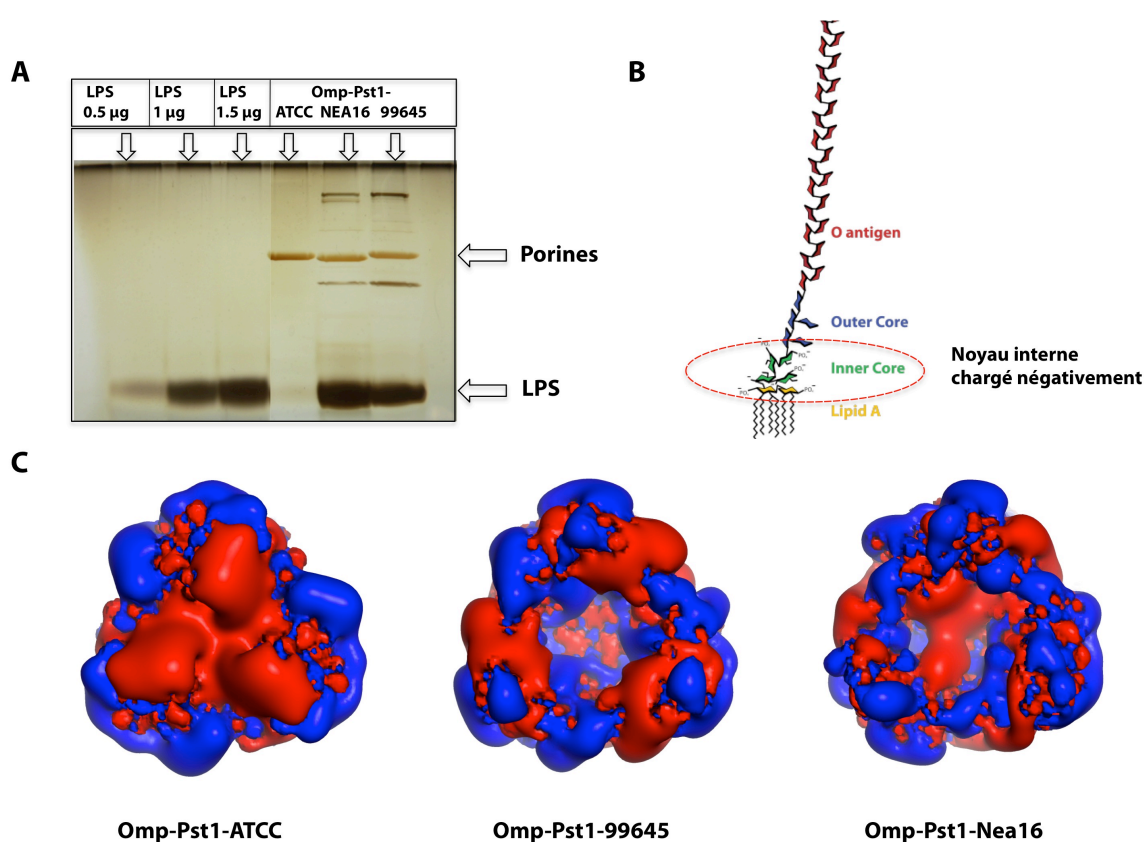


Figure 41: Caractérisation structurale de l'interaction entre LPS et porine A/ Gel SDS Page 15% coloré à l'argent et qui montre la persistance des molécules de LPS attachées aux variantes issues d'isolats cliniques après l'ajout d'une étape de délipidation. B/ Une représentation schématique d'une molécule de LPS, la région noyau oligosaccharidique, chargée négativement, est indiquée dans un cercle en pointillé rouge. C/ Le champ électrostatique développé au sein des porines est modélisé grâce au logiciel APBS après protonation à pH 7 (PDB2PQR/PROPKA) et en présence de 150 mM NaCl. Les structures d'Omp-Pst1, Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16 sont représentées vues du côté extracellulaire. Le potentiel électrostatique négatif est coloré en rouge et le positif en bleu. L'échelle représentée est en K_bT (K_b : Constante de Boltzmann; T: Température).

De par leur nature, les LPS constituent une barrière plus ou moins efficace contre la pénétration des molécules hydrophobes à travers la membrane externe des bactéries à Gram-

négatif ⁷. Il est ainsi possible d'imaginer que la présence de LPS aux pourtours des porines renforce la cohésion membranaire et limite ainsi la diffusion à travers la membrane. Notons que selon la nature de ces molécules, lisses ou rudimentaires, leurs chaînons extracellulaires peuvent atteindre des longueurs allant de 3 à 10 nm. Il est également possible d'attribuer un rôle à ces expansions dans le camouflage des porines dans la membrane, les rendant indétectables au système immunitaire. Ces hypothèses restent à explorer d'une façon plus fine pour comprendre le rôle physiologique d'interactions plus fortes entre porines et LPS.

I-4.5: Analyse fine des dimensions du canal

Afin de caractériser finement les propriétés de leurs canaux, nous avons soumis les structures de nos différentes porines au logiciel HOLE ¹²⁷. Brièvement, ce logiciel permet d'estimer les dimensions d'un canal protéique grâce à la translocation d'un proton, assimilé à une sphère de 1 Å de rayon, en son travers. Une fois dans le canal, ce proton se place à mi-distance des résidus qu'ils l'entourent, lui permettant, dans sa position, d'attribuer un rayon minimal au canal. Ainsi, ce calcul est répété à chaque progression de ce proton de 0.25 Å le long du canal. Suivant cette approche, nos résultats révèlent, à l'exception d'Omp-Pst2, une similarité dans l'architecture interne du canal des porines analysées (Figure 42). En effet, Omp-Pst2 possède, en addition de la zone de constriction à mi-hauteur du canal, une deuxième zone de constriction à 10 Å de l'entrée du canal sur le versant extracellulaire. Cette deuxième zone, comme celle à mi-hauteur, possède un diamètre de 5 Å, et pourrait conférer à Omp-Pst2 des propriétés sélectives stériques plus fines.

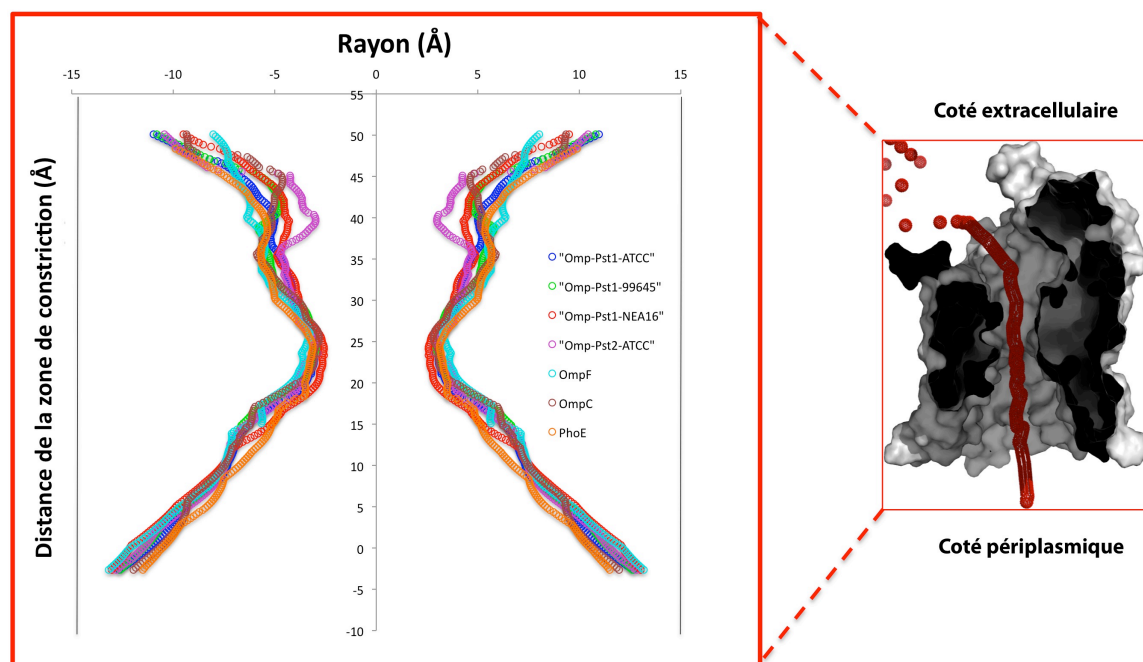


Figure 42: Modélisation de la dimension des canaux des porines. Les structures tridimensionnelles des différentes porines sont utilisées pour modéliser la dimension du canal suivant la translocation d'un proton dans son sein grâce au logiciel HOLE. Le graphique ci-dessus correspond aux valeurs de radius mesurées au sein du canal et suivant la progression d'un proton de 0.25 Å dans son sein. La zone de constriction est localisée à mi-hauteur du canal et correspond à une distance de 25 Å de part et d'autre de l'entrée du canal des deux côtés, extracellulaire et préplasmique, respectivement. La structure à droite du graphique correspond à Omp-Pst1-ATCC en mode surface, vue de l'intérieur du canal et le long de la membrane. La translocation du proton (0.25 Å) à l'intérieur du canal est également illustrée sous la forme de sphères rouges

I-4.6: Analyse fine de la sélectivité ionique du canal

Le processus itératif réalisé par HOLE permet non seulement de modéliser les dimensions du canal, mais également de caractériser sa charge nette le long du canal, en calculant le potentiel développé autour du proton tout au long de sa translocation. Ces calculs indiquent qu'Omp-Pst1 est anion-sélective, toutes variantes confondues, quand OmpF et surtout Omp-Pst2, sont cation-sélectives (Figure 43).

De façon remarquable, la figure 43 révèle pour Omp-Pst1 une sélectivité cationique à l'entrée du canal sur le versant extracellulaire (-75 kcal/mol). Cela est probablement dû à l'insertion du fragment peptidique 206-GVVTSEG-212, chargé négativement, dans sa boucle L5. Dans le canal, cependant, Omp-Pst1 montre une anion-sélectivité claire (+50 kcal/mol). Omp-Pst2 de son côté possède une sélectivité cationique très forte. Celle-ci est particulièrement importante, à l'entrée du canal, puis diminue progressivement en son long. Cette forte sélectivité localisée à l'entrée du canal pourra être attribuée à deux phénomènes synergiques. Le premier, à caractère électrostatique, est dû à l'insertion des deux résidus acides aspartiques

« 254-DD-255 » chargés négativement dans sa boucle L6 et le deuxième, à caractère stérique, est dû à la présence de la deuxième zone de constriction d'un diamètre de 5 Å. Cette analyse, étendue aux porines d'*E. coli*, révèle une sélectivité plus forte au sein des porines de *P. stuartii*. Ces observations résultent en une différence majeure dans la distribution des résidus chargés au sein des porines des deux espèces bactériennes, *P. stuartii* d'un côté et *E. coli* de l'autre. Il est notable qu'Omp-Pst2-ATCC possède le profil de sélectivité asymétrique le plus marqué entre les versants extra et intracellulaire parmi les porines étudiées (Figure 43). Cette observation suggère une asymétrie probable dans le transfert d'une molécule chargée, selon qu'elles passent dans un sens ou dans l'autre.

Les variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques préservent, voire renforcent, la sélectivité anionique observée dans la variante sauvage. De façon intéressante, la délétion du fragment peptidique chargé négativement 205-AGVVTSE-211 de leurs boucles L5 renforce notre hypothèse sur le rôle de cette boucle dans le basculement de sélectivité à l'entrée du canal d'Omp-Pst1-ATCC.

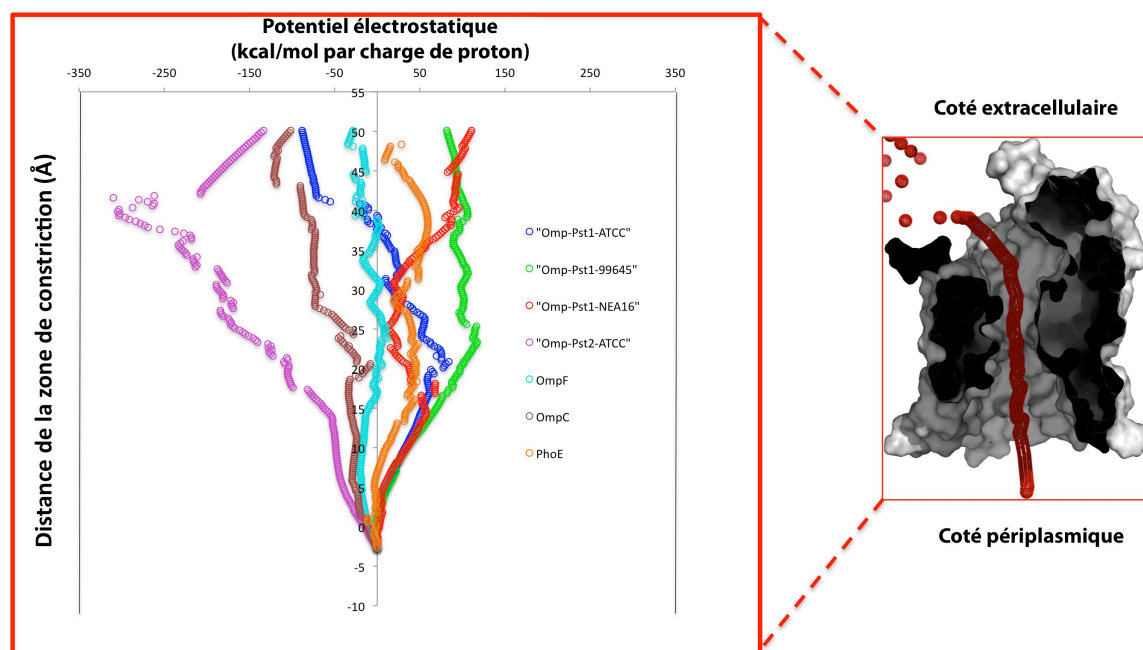


Figure 43: Modélisation de la sélectivité ionique au sein des canaux des porines. Les structures tridimensionnelles des différentes porines sont utilisées pour modéliser l'énergie associée à la translocation du proton le long du canal grâce au logiciel HOLE. Le graphique ci-dessus correspond aux valeurs du potentiel électrostatique présent au sein du canal et suivant la progression d'un proton (0.25 Å) dans son sein. La structure à droite du graphique correspond à Omp-Pst1-ATCC en mode surface, vue de l'intérieur du canal et le long de la membrane. La translocation du proton à l'intérieur du canal est également illustrée sous la forme de sphères rouges.

I-4.7: Distribution des charges au sein du canal

Afin de mieux caractériser la sélectivité observée au sein des porines, nous avons décidé de dénombrer les résidus chargés qui tapissent l'intérieur de leurs canaux. Nous avons, de même, utilisé le logiciel HOLE pour automatiser cette étape ¹²⁷. Alors nous faisons progresser un proton par marche de 0.25 Å le long du canal, les résidus chargés positivement (R: arginine et K: lysine) et négativement (D : acide aspartique et E : acide glutamique), et qui se retrouvent dans un rayon de 10 Å autour du proton, sont retenus. De façon similaire, les résidus chargés appartenant à la zone de constriction sont sélectionnés dans un rayon de 5 Å autour du point le plus rétréci de leur canal.

La comparaison des distributions de résidus chargés au sein du canal des canaux d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 rationalise leurs sélectivités précédemment attribuées, c'est-à-dire anion sélectif et cation sélectif, respectivement (Figure 44 A, B). En effet, 58% des résidus chargés tapissant le long du canal d'Omp-Pst1 possèdent une charge positive, contrairement à Omp-Pst2 où 56% des résidus chargés possèdent une charge négative. Cette observation est également reproduite dans leur zone de constriction respective avec 53.3% des résidus de charge positive chez Omp-Pst1 et 64% des résidus de charge négative chez Omp-Pst2 (Figure 44 C, D). Par ailleurs, l'alignement de séquence de ces deux porines révèle des mutations qui contribuent majoritairement au basculement de leurs sélectivités (Annexe 1). Ces mutations sont soit des substitutions de résidus chargés positivement chez Omp-Pst1 par des résidus non chargés chez Omp-Pst2-ATCC (K16Q, K28S, K65S, K76Q, K170L, K204N, K278T et K334D), soit des substitutions de résidus non chargés chez Omp-Pst1 par des résidus chargés négativement chez Omp-Pst2-ATCC (S25D, A120D, T122E, Q224E, N235D, N236E et Y311D), soit des délétions de résidus chargés positivement chez Omp-Pst1 (30-KK-31). Ces mutations, réparties tout au long du canal, concernent autant les boucles externes (L1-L8) ainsi que les feuillets β du tonneau ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 10$ et $\beta 14$). Notons que les deux substitutions, A120D et T122E localisées dans la boucle L3 d'Omp-Pst2-ATCC contribuent à l'augmentation des charges négatives dans la zone de constriction face aux résidus chargés positivement de la zone anti-L3. Ces différences structurales majeures entre Omp-Pst1-ATCC et Omp-Pst2-ATCC suggèrent des fonctions diffusives bien distinctes. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Tran et *al* et qui excluent Omp-Pst2-ATCC du mécanisme de translocation des antibiotiques ⁴⁴. Notons que ces auteurs ont également attribué par des études en électrophysiologie à l'échelle de la molécule unique une conductance de 3.4 nS pour Omp-

Pst2-ATCC face à 2.7 nS pour Omp-Pst1-ATCC. Puisque les différences entre rayons à la zone de constriction d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont anecdotiques, notre analyse indique que c'est le nombre de résidus chargés qui détermine la conductance d'une porine : plus de résidus chargés entraîne une conductance plus faible.

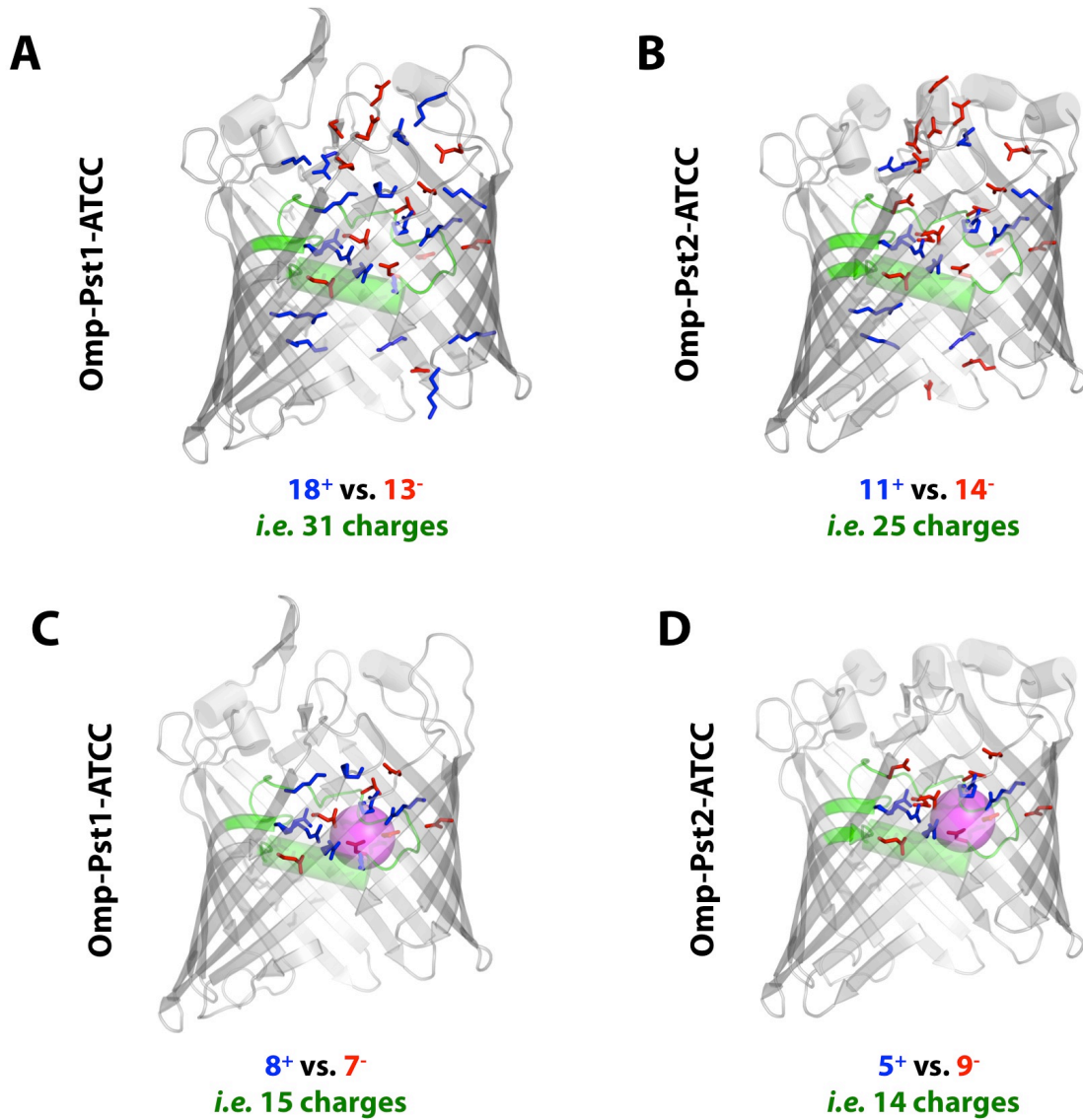


Figure 44: Distribution des résidus chargés au sein des canaux d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. A-B/ Vues latérales des monomères de porines colorés en gris. À l'intérieur du tonneau, une représentation stéréoscopique des résidus chargés tapissant l'intérieur du canal. Les résidus chargés négativement sont colorés en rouge et correspondent à des acides aspartiques (D) et/ou acides glutamiques (E) alors que les résidus chargés positivement sont colorés en bleu et correspondent à des arginines (R) et/ou des lysines (K). La boucle L3 est également représentée en mode bâton coloré en vert, au milieu du canal. C-D/ Distribution des résidus chargés dans la zone de constriction des porines. Les résidus chargés positivement chez Omp-Pst1-ATCC correspondent à K16, R39, R41, R59, K65, R129, R131, R222 et celles négatives correspondent à D12, D18, E61, E63, D104, D109 et D119. Les résidus chargés positivement chez Omp-Pst2-ATCC correspondent à R39, R41, R59, R129, R131, R222 et celles négatives à D12, D18, E61, E63, D104, D109, D119, D120, E122 et E224. Les mutations entre ces deux porines concernent K16Q et K65S, A120D, T122E et Q224E.

Nous avons comparé les distributions de résidus chargés le long des porines homologues d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 chez *E. coli*, i.e. OmpF et OmpC, respectivement. De façon remarquable, la comparaison d'Omp-Pst1 avec OmpF révèle une augmentation de 48% des résidus chargés le long de son canal (Figure 45 A, B). Cette augmentation concerne surtout des résidus chargés positivement. Chez Omp-Pst2, la comparaison par rapport à OmpC montre une légère augmentation de 8% dans le nombre de charges distribués le long de son canal (Figure 45 C, D). Cette augmentation concerne surtout des résidus chargés négativement. De façon similaire, cette augmentation du nombre de résidus chargés chez Omp-Pst1 et Omp-Pst2 est reproduite dans leurs zones de constriction (Figure 45 E, H). Cette distribution de charge assez particulière résulte en un champ électrostatique fort au sein de leurs canaux respectifs qui ne pourra se refléter que dans une sélectivité de passage plus forte que chez leurs homologues d' *E. coli* (OmpF et OmpC). Cette comparaison marque ainsi une différence significative dans l'évolution des porines entre deux espèces appartenant à la même famille (*entérobactéries*). Il est intéressant de mentionner, dans ce contexte, que *P. stuartii* est l'une des souches les plus résistantes aux antibiotiques de sa famille. Nos données suggèrent que ce phénotype de résistance corrèle avec une augmentation du nombre de résidus chargés au sein des porines.

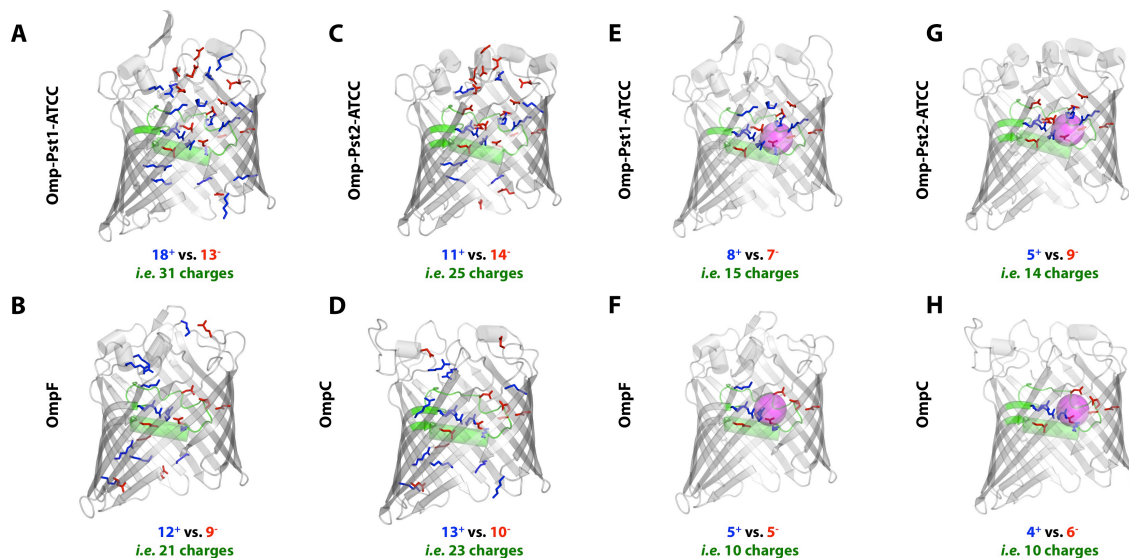


Figure 45: Distribution des résidus chargés au sein des canaux des porines de *P. stuartii* et leurs homologues de chez *E. coli*. A-D/ Vues latérales des monomères de porines en mode ruban et colorés en gris. À l'intérieur du tonneau, une représentation stéréoscopique des résidus chargés tapissant l'intérieur du canal. La boucle L3 est également représentée en mode bâton coloré en vert, au milieu du canal. E-H/ Distribution des résidus chargés dans la zone de constriction des porines. Représentation stéréoscopique des résidus chargés dans la zone de constriction en mode d'isolation de la structure complète. Les résidus chargés positivement chez OmpF correspondent à K16, R41, R129, K222 et celles négatives correspondent à D12, E61, D104, D109 et D119. Les résidus chargés positivement chez OmpC correspondent à K16, R41, R129, K222 et celles négatives à D12, D18, E61, D104, D109 et D119. Les mutations dans cette zone par rapport à Omp-Pst1 concernent les résidus R39Y, R59Q, K65Q et R131G, D18V et E63N pour OmpF et les résidus R39Y, R59Q, K65Q, R131N et E63N pour OmpC.

La comparaison des profils de charge des variantes d'Omp-Pst1 (Omp-Pst1-ATCC, Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16) montre une légère augmentation du nombre de charges positives (le long du canal et dans la zone de constriction) chez les variantes issues d'isolat cliniques (Figure 46).

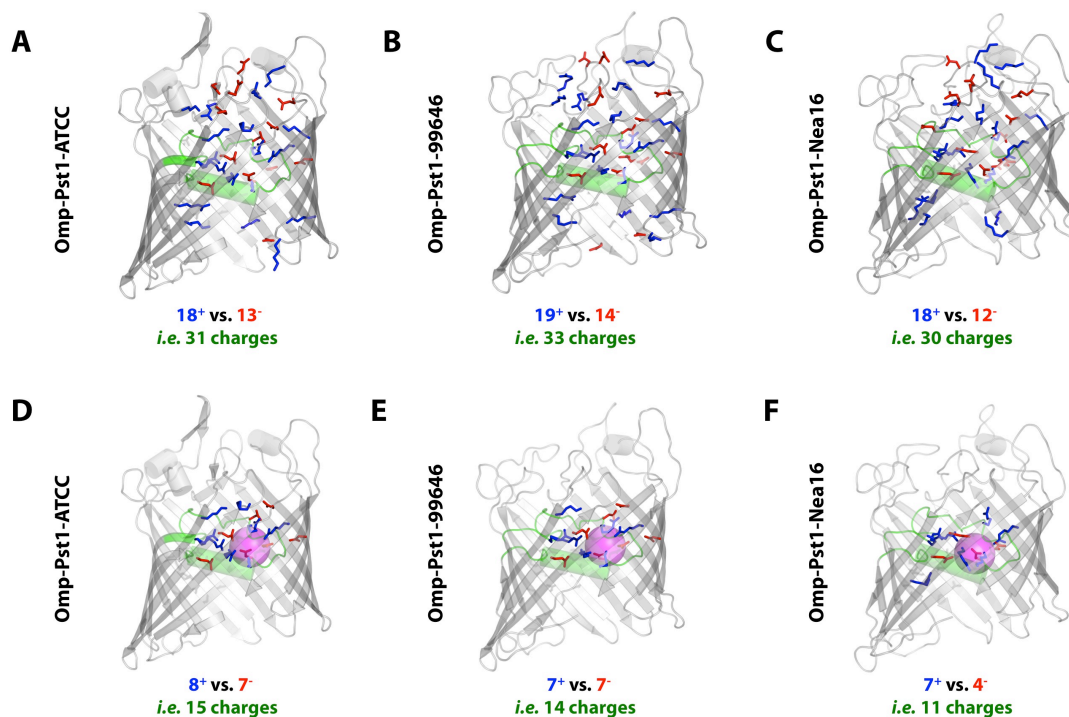
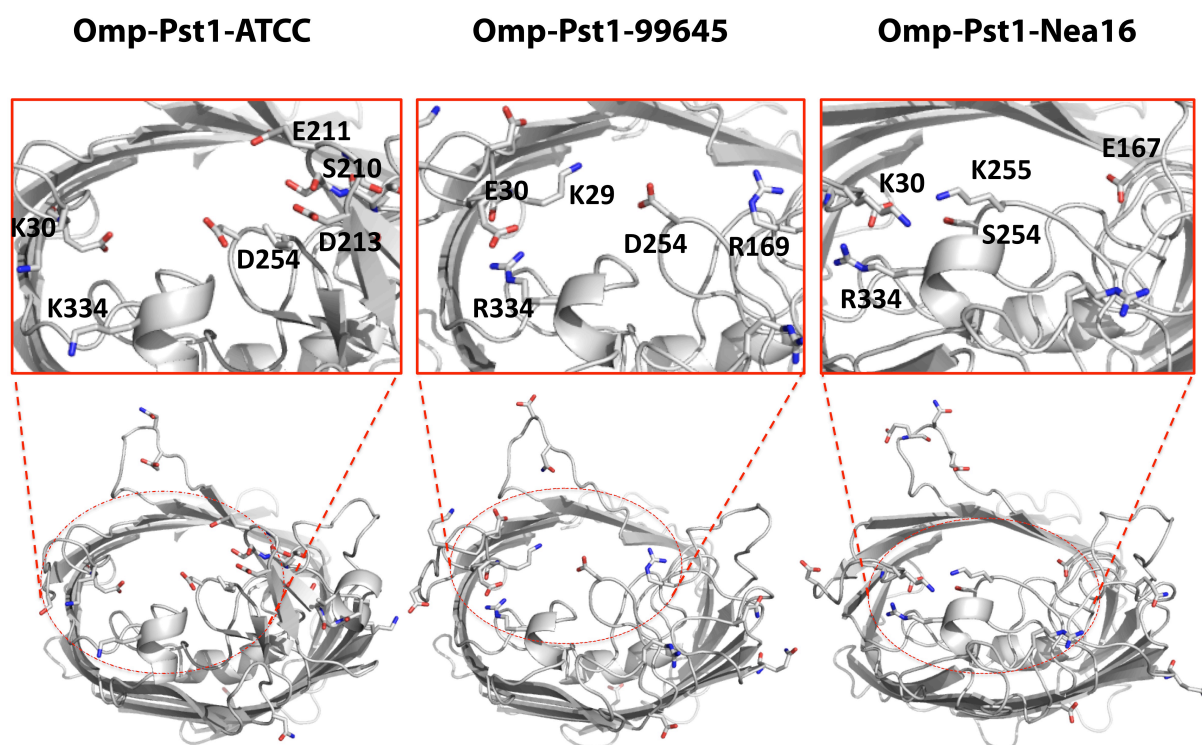


Figure 46: Distribution des résidus chargés au sein des canaux des variantes d'Omp-Pst1. A-C/ Vues latérales des monomères de porines colorés en gris. À l'intérieur du tonneau, une représentation stéréoscopique des résidus chargés tapissant l'intérieur du canal. Les résidus chargés négativement sont colorés en rouge et correspondent à des acides aspartiques (D) et/ou acides glutamiques (E) alors que les résidus chargés positivement sont colorés en bleu et correspondent à des arginines (R) et/ou des lysines (K). La boucle L3 est également représentée en mode bâton coloré en vert, au milieu du canal. D-F/ Distribution des résidus chargés dans la zone de constriction des porines. Représentation stéréoscopique des résidus chargés dans la zone de constriction en mode d'isolation de la structure complète, vue du côté extracellulaire.

Les mutations observées chez les variantes cliniques sont surtout localisées au sein des boucles externes L1 et L4-L8. La boucle L3 est quant à elle conservée. La figure 47 montre la localisation de ces mutations à l'entrée du canal des trois variantes. Parmi ces mutations, celles qui affectent le plus l'accessibilité au canal concernent deux insertions des résidus K29 et K255 chez Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16, respectivement, et une délétion commune des résidus chargés négativement E211 et D213 (Figure 47 A). Ces mutations rendent in fine le canal des variantes cliniques plus positif, donc plus anion-sélectif (Figure 47 B).

A



B

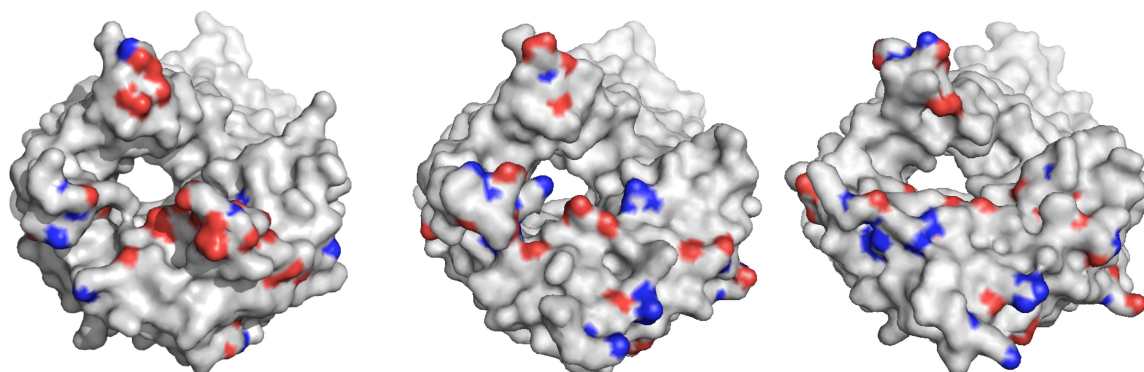


Figure 47: Localisation des mutations au sein des trois variantes d’Omp-Pst1 à l’entrée du canal. A/ Les trois structures des variantes d’Omp-Pst1 sont colorées en gris et représentées en mode ruban, vue du côté extracellulaire. Pour faciliter l’interprétation, un seul monomère du trimère est représenté. Les résidus chargés concernés par des mutations au sein des variantes d’Omp-Pst1 issues d’isolats cliniques, et localisés à l’entrée du canal, sont représentés. B/ La même vue des trois structures, du côté extracellulaire, est représentée en mode surface. Les couleurs rouge et bleu correspondent à la répartition des charges négatives et positives des résidus illustrés en A, respectivement.

Nous rappelons dans ce contexte que ces variantes d’Omp-Pst1 issues d’isolats cliniques ont été isolées chez des patients ayant contracté une infection nosocomiale à *P. stuartii*, et n’ayant pas guéri suite au traitement classique par l’imipénème, un carbapénème chargé positivement de la dernière génération utilisé comme dernière ligne de traitement en milieu hospitalier. Notre hypothèse est que cette redistribution de charges au sein des porines illustre une réponse « évoluée » au traitement antibiotique administré. Nous postulons que le traitement a

induit des mutations visant à réduire l'influx de l'imipénème. Dans ce contexte que le pourtour des variantes cliniques d'Omp-Pst1 soit chargé plus positivement, résultent en une interaction plus forte avec les LPS, pourrait également jouer un rôle dans la limitation de la diffusion de l'imipénème au travers de la membrane, par renforcement de la cohésion membranaire.

I-4.8: Analyse structurale du complexe porine-maltose

Nous avons résolu la structure cristallographique du complexe formé entre Omp-Pst1 et le maltose à 3 Å de résolution (Figure 48). Nous avons pu placer le ligand dans deux sites, le premier occupé à 100% dans les trois monomères du trimère, et située à l'entrée de la porine, du côté extracellulaire, dans un creux formé par l'avancée de la boucle L6 au-dessus du tonneau β . Le second site de fixation est trouvé dans la zone de constriction d'un des monomères. Cette observation d'un seul canal occupé suggère que dans le cristal au moins, les trois monomères du trimère ne sont pas équivalents. Le premier site de fixation est contribué par les résidus K31, G253 et Q120. Le second site de fixation est, quant à lui, composé des chaînes latérales des résidus R129 et K76. Il est intéressant de noter que chez Omp-Pst2, le résidu K31 et K76 sont deletés et mutés en Q, respectivement. Cette observation suggère que le transport du maltose soit une spécificité d'Omp-Pst1. Chez *E. coli* le transport des sucres est pris en charge par des porines spécifiques, telles que LamB (maltose) et Scry (sucrose). Puisque ces porines spécifiques n'ont pas d'équivalentes chez *P. stuartii*, ses porines non spécifiques pourraient cumuler certaines de leurs fonctions, en particulier Omp-Pst1.

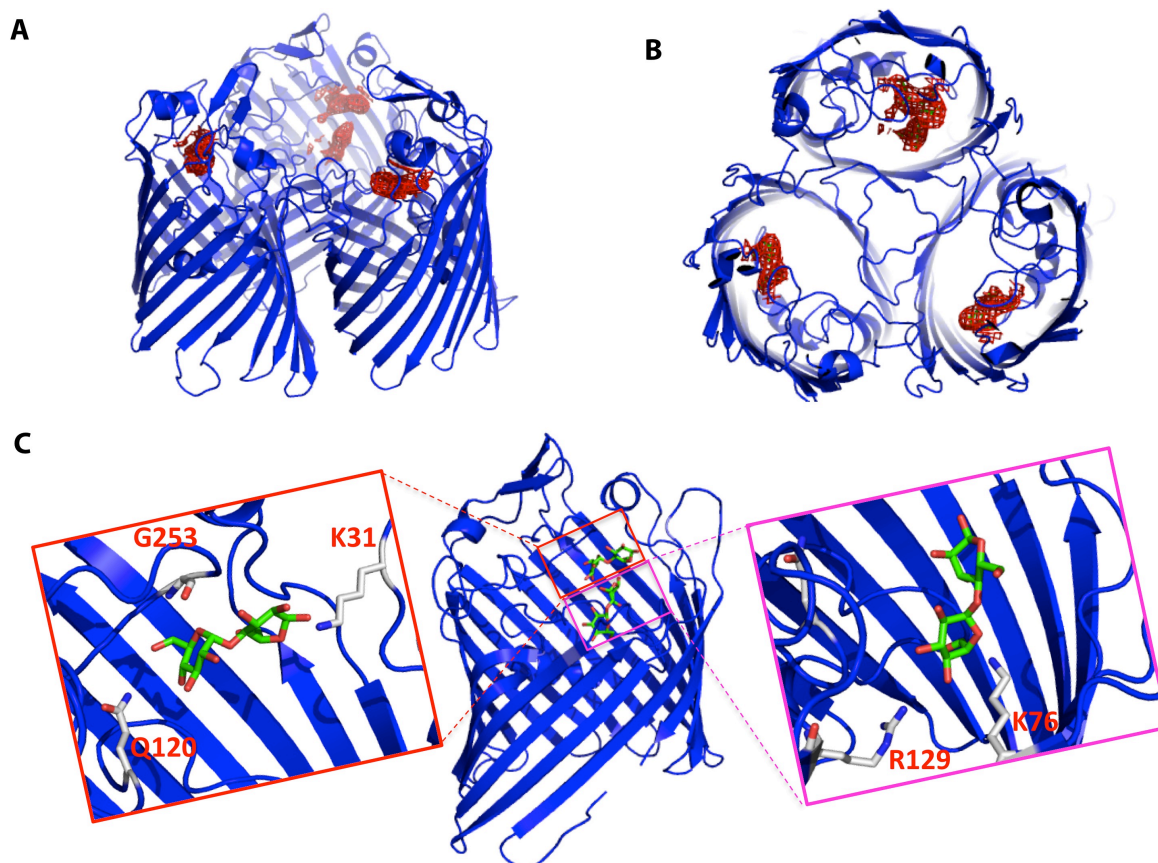


Figure 48: Caractérisation structurale du complexe Omp-Pst1 en présence du maltose. A/ Vue latérale de la structure trimérique d'Omp-Pst1, colorée en bleu. Dans le canal, les quatre sites du maltose sont représentés (vert) en présence de leur carte de densité électronique (rouge) 2Fo-Fc à 1 σ . B/ La même représentation en A, vue du côté extracellulaire. C/ Vue latérale du monomère d'Omp-Pst1 contenant les deux sites du maltose. Les deux molécules de maltose sont représentées en mode stéréoscopique où les liaisons C - C sont colorées en vert et les liaisons C - O en rouge. Vue de la zone d'interaction du maltose au sein du canal, les résidus impliqués dans l'interaction du premier site d'interaction avec le maltose sont indiqués dans le quadrant rouge et correspondent à K31, Q120 et G253. Contrairement aux résidus impliqués dans le deuxième site de fixation et qui correspondent à K76 et R129, ils sont indiqués dans un quadrant coloré en magenta. Ces résidus sont représentés en mode stéréoscopique où les liaisons C - C sont colorées en gris et les liaisons C - N en bleu (< 3 Å).

I-5: Mesures de la cinétique de translocation des antibiotiques par électrophysiologie

Afin de caractériser la perméabilité aux antibiotiques des variantes cliniques d'Omp-Pst1, nous avons eu recours à des études fonctionnelles en électrophysiologie. Ces études ont été réalisées dans le cadre de deux collaborations (M Winterhalter et M Vivaudou) et ont permis la consolidation de notre compréhension structurale.

I-5.1 : Mesures de la cinétique de translocation des antibiotiques par la méthode des gouttelettes à l'interface (DIB)

Dans un premier temps, nous nous sommes formés, quoique superficiellement, à une méthode d'électrophysiologie développée au sein de l'IBS et qui permet de sonder le passage de molécules au travers des porines. En collaboration avec A Martel et M Vivaudou, nous avons mesuré, pour les trois variantes d'Omp-Pst1, les temps et fréquences de translocation de divers antibiotiques de type β -lactames. La figure 49 (A, B) montre le dispositif expérimental de la méthode des gouttelettes à l'interface ou Droplet bilayer interface (DIB), ainsi que les traces obtenues, avant et après l'insertion des porines d'Omp-Pst1. Lorsque la membrane se forme, on observe de brusques sauts de courant d'environ 80 pA (Figure 49 C, D). Chacun de ces événements révèle l'insertion d'une porine d'Omp-Pst1 caractérisée par une conductance de 2.7 nS⁴⁴. Nous admettons que le fait que les mesures soient faites sur plusieurs porines à la fois rend difficile l'obtention de données. Nous avons donc surtout pensé utiliser cette méthode afin de cribler les molécules pouvant ou ne pouvant pas passer au travers de nos porines. La figure 49 D montre le passage de l'ampicilline à travers Omp-Pst1. Ceci est traduit par une augmentation de la fréquence des pics qui correspondent à des événements de passage de l'antibiotique.

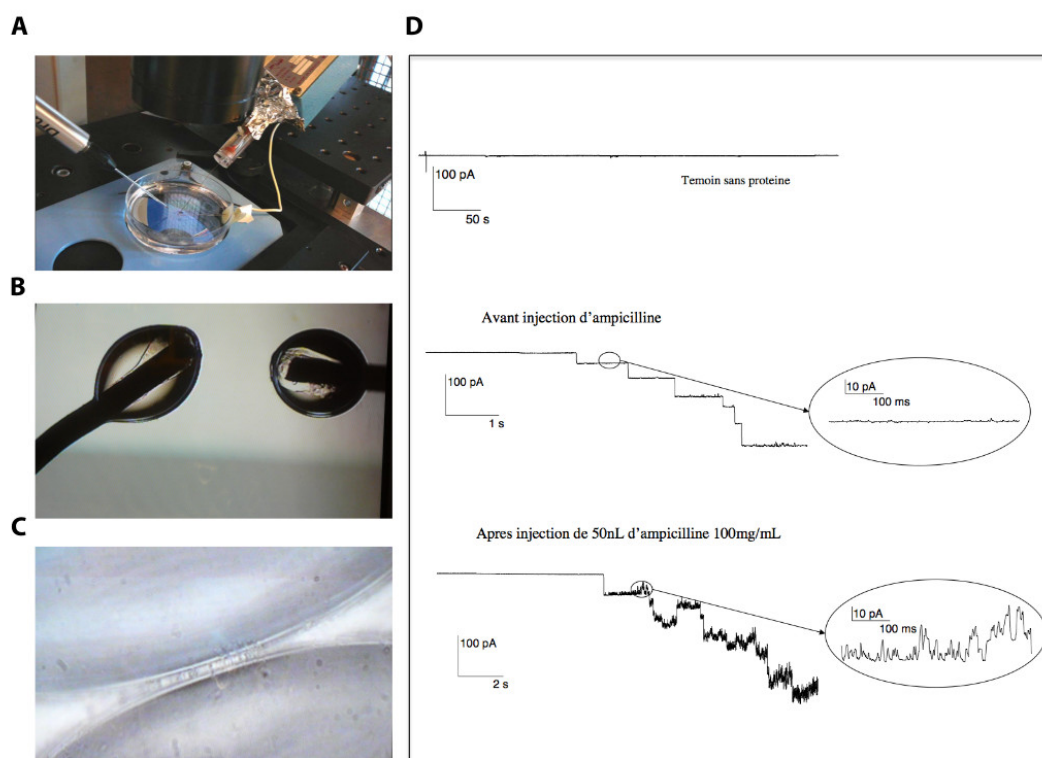


Figure 49: Criblage des antibiotiques par la méthode des gouttelettes à l'interface (DIB). A/ Une représentation du dispositif expérimental de la méthode DIB qui montre deux électrodes d'Ag/AgCl plongées dans un bain d'hexadécane B/ Deux gouttes d'une solution aqueuse de lipides sont déposées à l'extrémité des deux électrodes respectivement. Une fois que les électrodes baignent dans le bain d'hexadécane, les lipides contenus dans les gouttes se positionnent en monocouche à l'interface eau/huile en raison de leur structure amphiphile. C/ En rapprochant les gouttes, la proximité des monocouches résulte en la formation d'une bicouche lipidique (membrane artificielle). D/ Les traces de courants sont par la suite enregistrées, avant et après l'insertion des porines d'Omp-Pst1. Suite à l'insertion des porines dans la bicouche, une injection

de l'ampicilline dans une des deux gouttes est réalisée (50 nl à 100 mg/ml).

I-5.2 : Mesures de la cinétique de translocation des antibiotiques par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM)

Les mesures fines de cinétiques de translocations furent réalisées sur des trimères uniques de porines par nos collaborateurs de l'université Jacobs de Brèmes en Allemagne (H Bajaj, QT Tran, KR Mahendran et M Winterhalter). Ces mesures fournissent la cinétique de translocation d'un antibiotique à l'entrée (K_{on}) et à la sortie (K_{off}) du canal d'une porine (Figure 50 A, B). Nous avons mesuré, suivant cette approche, les K_{on} et K_{off} à travers les variantes d'Omp-Pst1 de trois antibiotiques: l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème, appartenant à la classe des carbapénèmes. Les deux premiers antibiotiques sont des zwitterions, contrairement à l'ertapénème qui est chargé négativement (Figure 50 C). Nos résultats révèlent une cinétique de translocation rapide pour l'ertapénème à l'entrée du canal de la variante sauvage d'Omp-Pst1 (K_{on} : 14 000 $M^{-1}s^{-1}$) laquelle est d'autant plus marquée chez les variantes cliniques (Omp-Pst1-99645 : K_{on} : 20 000 $M^{-1}s^{-1}$; Omp-Pst1-Nea16 : K_{on} : 25 000 $M^{-1}s^{-1}$). À l'inverse de ce qui a été observé pour l'ertapénème, les deux zwitterions (l'imipénème et le meropenème) révèlent, quant à eux, une cinétique de translocation moins rapide à l'entrée de la variante sauvage d'Omp-Pst1 (K_{on} : 2500 $M^{-1}s^{-1}$) et qui décroît de plus à l'entrée des deux variantes cliniques (K_{on} : <1000 $M^{-1}s^{-1}$).

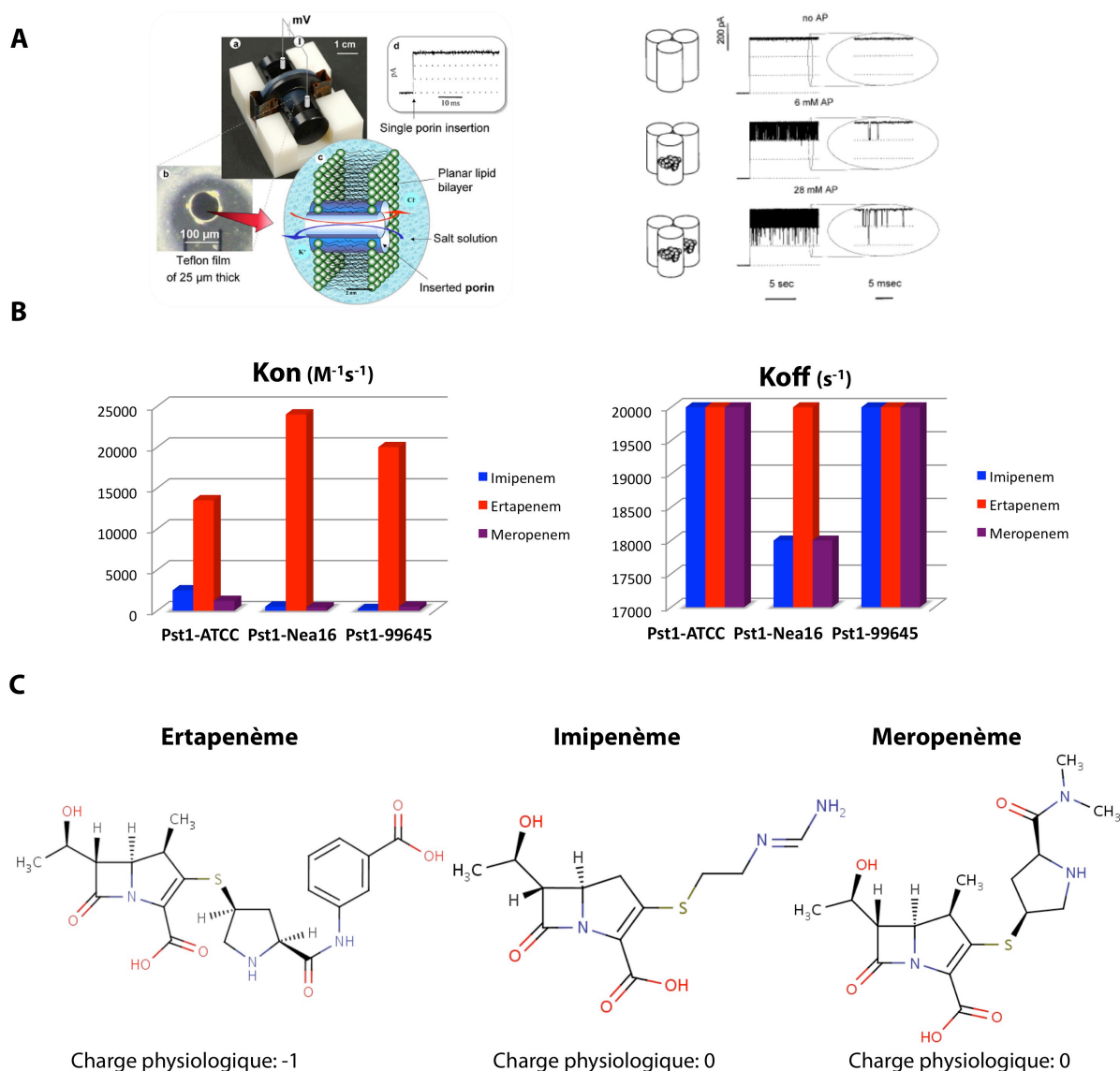


Figure 50: Mesure de la cinétique de translocation des antibiotiques par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM) (image adoptée de ¹²⁸). A/ Une représentation du dispositif expérimental de la méthode des membranes de lipides noirs ou « Black Lipid Membrane ». Les électrodes baignent dans deux chambres de part et d'autre d'une membrane en téflon avec un orifice servant comme support pour former la bicouche lipidique (à gauche). Lorsque la porine s'insère dans la membrane, un courant est détecté. Le passage des antibiotiques à travers les canaux de porines crée des événements de translocation (à droite). B/ Les constantes mesurées à l'entrée (K_{on}) et à la sortie (K_{off}), du canal sont représentées sur le diagramme ci-dessus, pour les trois variantes d'Omp-Pst1. C/ La structure des trois antibiotiques carbapénèmes testés par la méthode d'électrophysiologie sur des films noirs (BLM).

Ensemble, nos résultats fonctionnels et structuraux indiquent donc qu'une augmentation de la charge positive nette du canal d'Omp-Pst1 résulte en une translocation plus rapide des antibiotiques chargés négativement, et en un ralentissement de celle des antibiotiques zwitterionique. Structuralement, cet effet répond surtout à des mutations dans les boucles externes L1 et L4-L8. Puisque la zone de constriction n'est pas touchée, c'est donc l'approche de l'antibiotique qui est modulée par les mutations observées dans les variantes cliniques.

Ces résultats confortent un peu plus l'idée d'une évolution des porines exprimées au sein des isolats cliniques en fonction de l'antibiothérapie appliquée. En effet, l'augmentation de la charge positive des boucles externes des variantes cliniques d'Omp-Pst1 corrèle avec une diminution de la cinétique de translocation de l'imipénème. Par ailleurs, des mesures de concentrations minimales inhibitrices (MIC) de l'imipénème ont été entreprises, en collaboration avec l'équipe du JM Pagès à Marseille. Pour les deux isolats cliniques, les valeurs de MIC observées sont supérieures à celle mesurée pour la souche sauvage (Des valeurs de MIC de 8, 4 et 2 $\mu\text{g/ml}$ ont été assignées aux souches exprimant Nea16, 99645 et Omp-Pst1-ATCC, respectivement). Nos résultats suggèrent que cette différence de susceptibilité à l'imipénème entre la souche sauvage et les isolats cliniques pourraient être liée à l'expression de porines modifiées. Notons qu'un tel aspect de résistance serait bénéfique à la bactérie, lui permettant de limiter la pénétration des antibiotiques en son sein tout en préservant sa capacité à se nourrir. Il rendrait par ailleurs le système des pompes à efflux plus efficace dans l'expulsion des antibiotiques. Cette compréhension à l'échelle atomique de l'évolution structurale au sein des porines pourrait à terme permettre une progression dans la compréhension des déterminants structuraux à la translocation efficace d'un antibiotique *via* une porine.

I-6:Étude du mécanisme de translocation du méropénème et de l'imipénème au travers la variante sauvage d'Omp-Pst1

Les mesures de translocation d'antibiotiques à l'échelle de la molécule unique en BLM n'ont pas pu déterminer le K_{off} des trois carbapénèmes étudiés : l'imipénème le meropenème et l'ertapénème. Afin de s'affranchir à cette limitation des méthodes complémentaires restent requises. Une étude combinant trois méthodes issues de disciplines scientifiques distinctes, *i.e.* l'électrophysiologie, la microbiologie et la biochimie, a permis de mieux comprendre le mécanisme de translocation du meropenème et de l'imipénème au travers la variante d'Omp-Pst1 de la forme sauvage. Cette étude a été le fruit d'une collaboration avec l'équipe de M Winterhalter à Brèmes, Allemagne et l'équipe de JM Pagès, à Marseille, et est présentée sous la forme d'un article scientifique en Annexe 4.

I-7:Étude du mécanisme de voltage gating chez Omp-Pst2-ATCC par dynamique moléculaire

Il est connu que les porines subissent une fermeture à haut voltage, un phénomène appelé « gating ». Le voltage gating survient en trois étapes pour un trimère, chacune correspondant à la fermeture d'un monomère ¹²⁹⁻¹³⁴. Pour la plupart des porines, le voltage critique à partir duquel est observé le gating se situe entre 90-200 mV. L'électrophysiologie à l'échelle du trimère de porine unique a permis de découvrir qu'Omp-Pst2 présente une très forte sensibilité au voltage et se ferme à des voltages parfois aussi bas que 20 mV. De plus, les mesures expérimentales semblent indiquer que le gating est asymétrique. Afin d'élucider les déterminants moléculaires responsable de cette forte sensibilité au voltage d'Omp-Pst2, nous avons eu recours à la dynamique moléculaire. Les simulations, réalisées en collaboration avec le laboratoire de Y Xu en Chine, révèlent, et pour la première fois, la base moléculaire du gating chez les porines. Cette étude est présentée sous la forme d'un article en cours de soumission en Annexe 5.

II- Rôle des porines de *Providencia stuartii* dans la persistance des infections bactériennes

Les structures d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont suggestives d'une implication de ces porines dans l'adhésion intercellulaire. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons donc examiné les propriétés putatives *in vitro* et *in vivo* de ces porines. Nous nous sommes en particulier intéressés à la participation des porines dans la genèse des biofilms. A dessein, nous avons utilisé un panel très large de méthodologies, permettant des caractérisations de l'échelle atomique à l'échelle supra-cellulaire. Ces approches et les résultats obtenus sont détaillés ci-après.

II-1: Rôle des porines dans l'interaction intercellulaire

La première structure de dimère de trimères que nous avons résolu est celle d'Omp-Pst2, à 2.2 Å de résolution (Section I du chapitre résultats et discussion). L'hexamère est formé par l'association de trimères via leurs boucles externes (Figure 51 A). Pour vérifier si une telle structure hexamérique pouvait être observée pour Omp-Pst1, nous avons tenté de la cristalliser dans différentes conditions, notamment en présence d'additifs et d'antibiotiques. C'est ainsi que nous avons obtenu sa structure hexamérique à 3.2 Å de résolution, laquelle reproduit l'arrangement en dimère de trimères observé pour Omp-Pst2 (Figure 51 C). Les structures montrent que dans ces dimères de trimères, chacun des monomères reste accessible grâce à trois fenestrations ellipsoïdales entre les trimères. Ces fenestrations sont plus larges chez Omp-Pst2 (Figure 51 B) que chez Omp-Pst1 (Figure 51 D). La simple présence de ces ouvertures suggère que ces dimères de trimères sont plus des jonctions adhésives que des pseudo-jonctions étanches (ou Gap junctions) prokaryotes¹³⁵. Ainsi, même si deux bactéries adhéraient l'une à l'autre *via* un dimère de trimères de porine appartenant à deux cellules différentes, chacune d'entre elles préserverait sa capacité à ingérer ou expulser des solutés. Ces fonctions adhésives des porines seraient donc supplémentaires et non pas exclusives des fonctions diffusives. Il apparaît cependant difficile, d'après la structure des hexamères d'Omp-Pst1, que des molécules plus larges que l'eau puissent pénétrer le dimère du trimère de l'extérieur. Ainsi, la jonction d'Omp-Pst1 serait étanche en termes de fuite de solutés, mais pas en termes de potentiel (H_2O , H^+ et e^- pouvant encore transiter).

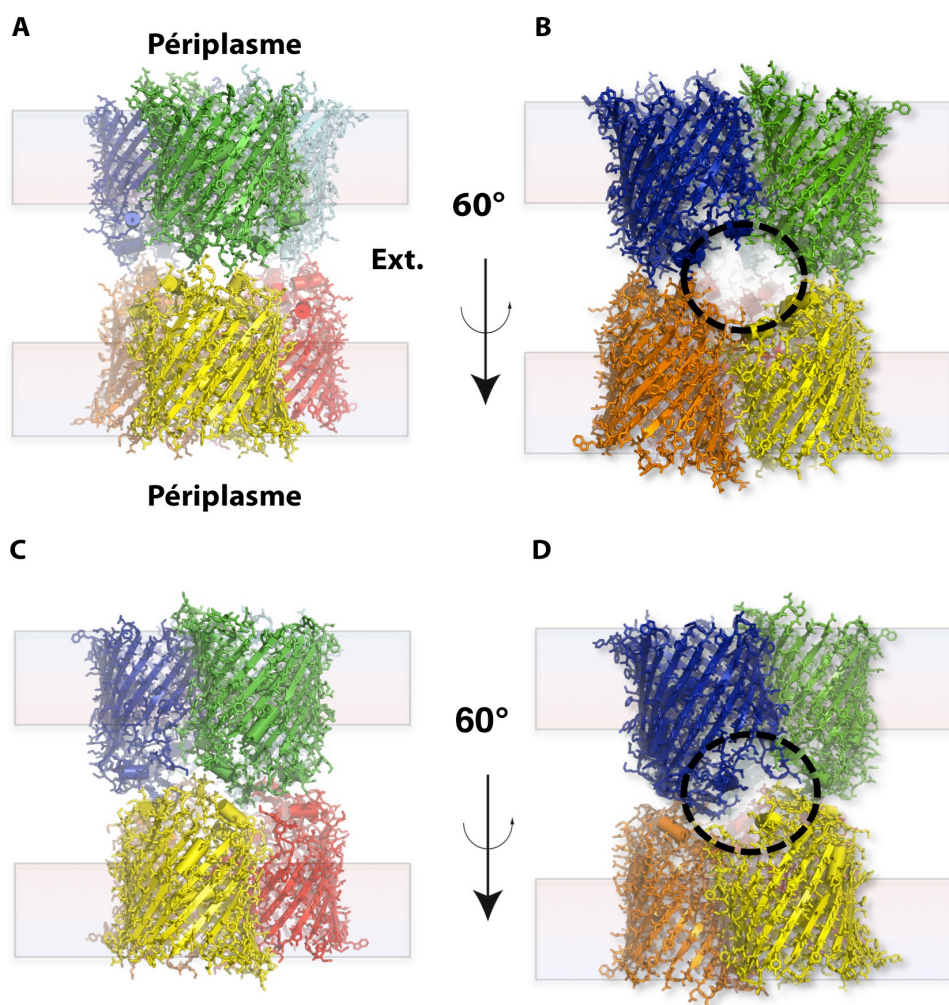


Figure 51: Les structures hexamériques d'Omp-Pst2 et d'Omp-Pst1, formées par l'association en face à face de deux trimères fonctionnels. La structure hexamérique d'Omp-Pst2 (A), résolue à 2.2 Å et d'Omp-Pst1 (C), résolue à 3.2 Å, vue à travers la membrane. La rotation de 60° des vues en A et C, montre l'existence des fenestrations ellipsoïdales localisées à proximité de l'interface d'interaction entre les deux trimères d'Omp-Pst2 (B) et d'Omp-Pst1 (D). Chaque monomère, au sein d'un hexamère, est coloré distinctement pour faciliter l'interprétation.

II-1.1: Etude des propriétés adhésives des porines *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons vérifié si les protéines conservent leur propriété d'adhésion *ex-cristallo*. Pour cette expérience, nous avons utilisé les liposomes comme systèmes rapporteurs.

II-1.1.1: Caractérisation par DLS

Nous avons commencé l'étude des propriétés adhésives d'Omp-Pst1 et d'Omp-Pst2 en mesurant la variation de taille des complexes formés en fonction de la concentration. Pour ce faire, nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière (DLS) qui mesure le rayon hydrodynamique des particules en suspension. Par rayon hydrodynamique est entendu le

rayon de la particule solvatée, soit par de l'eau et des ions, soit par de l'eau, des ions et des molécules de détergent. Afin de vérifier si cette interaction dépend du pH, nous avons réalisé nos mesures à pH 4 et à pH 8. Les résultats obtenus sur les porines sauvages, Omp-Pst1 et Omp-Pst2, montrent que les deux protéines passent d'un état monomérique (monomère de trimère) à un état dimérique (dimère de trimère) au fur et à mesure que la concentration en protéine augmente (Figure 52). Les constantes de dissociation des dimères d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont 374 et 830 nM à pH 4, et 332 et 709 nM à pH 8, respectivement. L'auto-association des porines de *P. stuartii* en dimères de trimères ne dépend donc pas du pH.

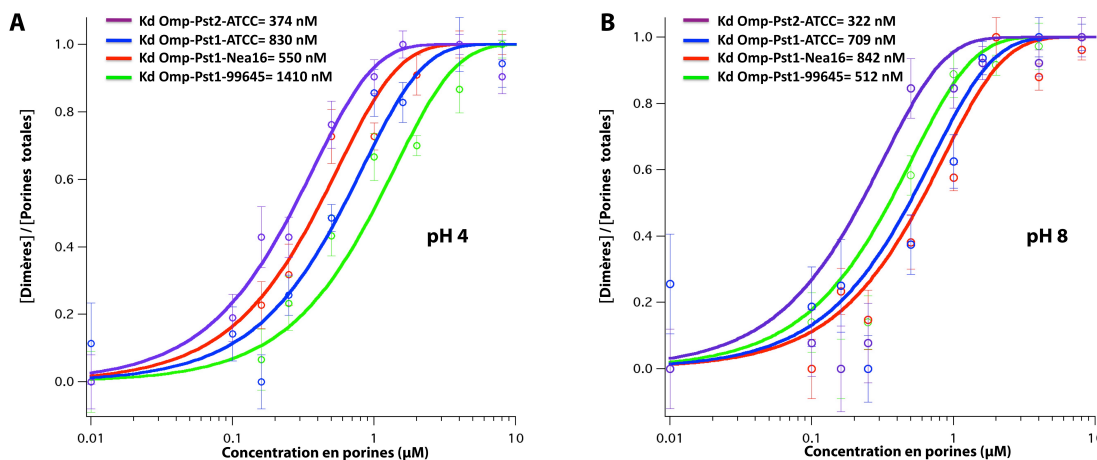


Figure 52: Conservation de la propriété d'auto-adhésion entre les variantes sauvages et mutantes des porines de *P. stuartii*. Le rapport entre la concentration dimériques et totales de porines (Omp-Pst1, Omp-Pst2, Omp-Pst1-Nea16 et Omp-Pst1-99645) présentes en solution est représenté en fonction de la concentration de porines à pH 4 (A) et 8 (B). Un rapport de 1 correspond ainsi à la forme de porines dimériques majoritaire en solution contrairement à un rapport de 0 où la forme trimérique est plutôt majoritaire. Les courbes représentées suivent une cinétique de premier ordre. Chaque valeur représentée sur le graphique correspond à une moyenne de dix acquisitions. Les barres d'erreurs rendent compte de l'incertitude sur la reproductibilité des données mesurées. Les constantes de dissociations sont déterminées à partir des points d'inflexions des courbes.

Si ces propriétés auto-adhésives des porines sont importantes pour la physiologie de la bactérie, une pression de sélection doit permettre de conserver ces propriétés dans les variantes cliniques d'Omp-Pst1 (Omp-Pst1-99645 et Nea16). Nous avons vérifié cette hypothèse, et, effectivement, ces deux variantes préservent cette capacité d'auto-association déjà observée chez les porines sauvages (Figure 52). Dans leur cas, on observe que la constante de dissociation du dimère de trimère est légèrement dépendante du pH. Nous notons pour le lecteur qu'Omp-Pst2 est préservée au résidu près dans les isolats cliniques. Il n'y a donc pas de variantes cliniques d'Omp-Pst2⁶².

Afin de vérifier si les capacités d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 à s'auto-associer sont préservées

dans un contexte membranaire, nous les avons reconstituées dans des liposomes et avons vérifié la tendance de ces derniers à former des agrégats protéoliposomiaux. L'approche a consisté à diluer les porines solubilisées par le LDAO dans des solutions de liposomes préformés; parce que la concentration en LDAO passe brutalement en dessous de sa CMC, les porines s'insèrent dans les liposomes ou précipitent. Un pré-requis a été de déterminer la concentration effective en détergent dans nos solutions stocks de protéines purifiées et concentrées. Il est en effet difficile d'estimer cette dernière en sortie de concentration sur filtre. Pour le LDAO, la CMC rapportée par la littérature varie entre 1 et 2 mM, selon les conditions de mesure. Kauffman et *al* attribuent une CMC de 1.7 mM (0.023 %) au LDAO en présence de NaCl ¹³⁶. En utilisant la chromatographie sur couche mince, nous avons pu estimer que nos solutions stocks d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 concentrées à 6.5 mg/ml contiennent 0.24 et 0.16 % de LDAO (Figure 52), soit ~10 et ~7 fois la CMC. Après dilution, le LDAO se trouve au dessous de sa CMC (0.023 %) et passe de son état micellaire (0.24 % pour Omp-Pst1 et 0.16 % pour Omp-Pst2) en molécules de détergent libres (< 0.004 % pour Omp-Pst1 et < 0.0026 % pour Omp-Pst2) (Figure 53).

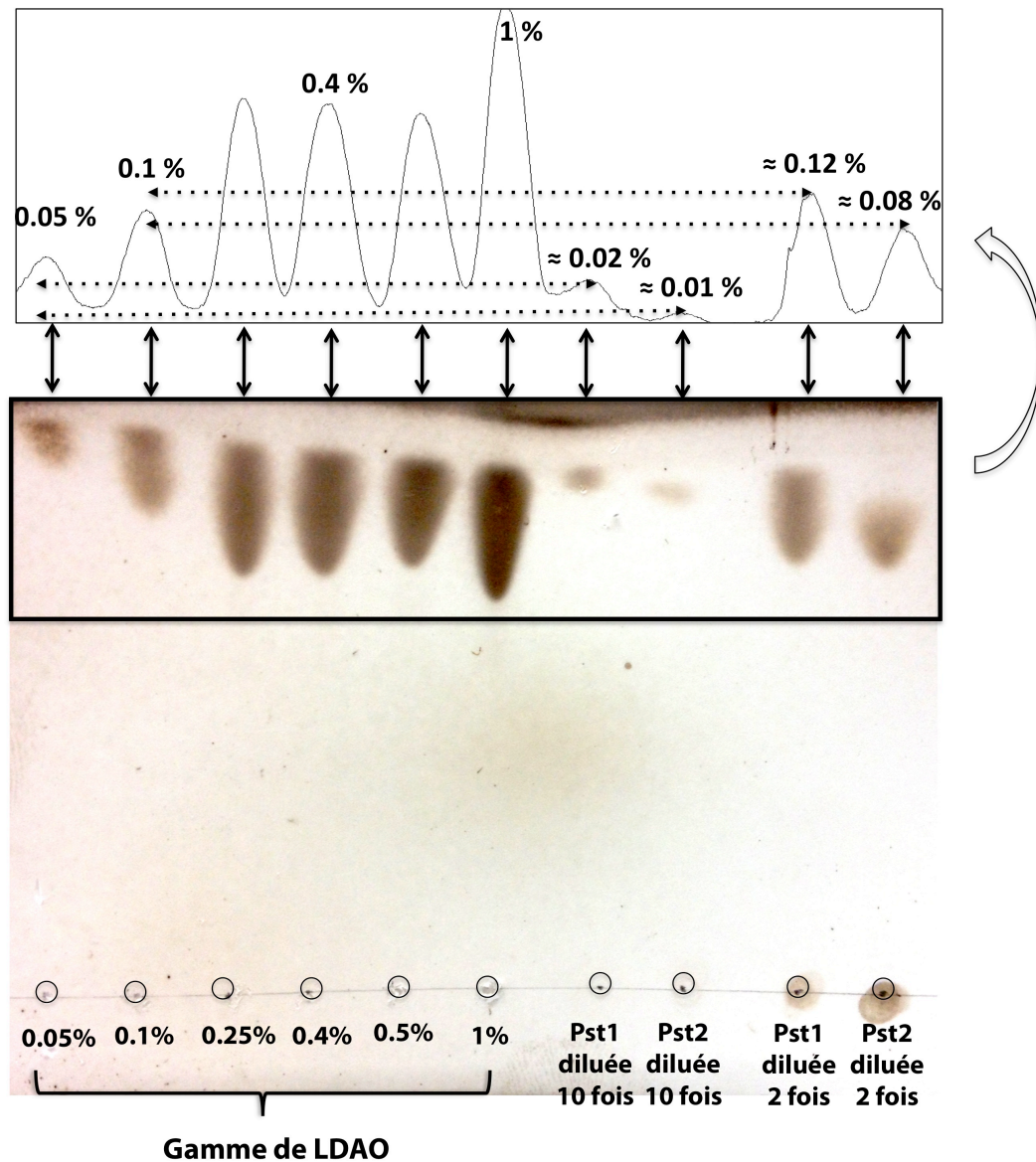


Figure 53: Chromatographie sur couche mince des solutions stocks d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. Le graphe au dessus de la plaque rapporte l'intensité intégrée des taches révélées sur la plaque (Image J). Les solutions d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 ont été diluée d'un facteur de deux et dix avant leur dépôts, respectivement. L'intensité des taches provenant des échantillons protéiques est ainsi comparée avec celle de la gamme de LDAO.

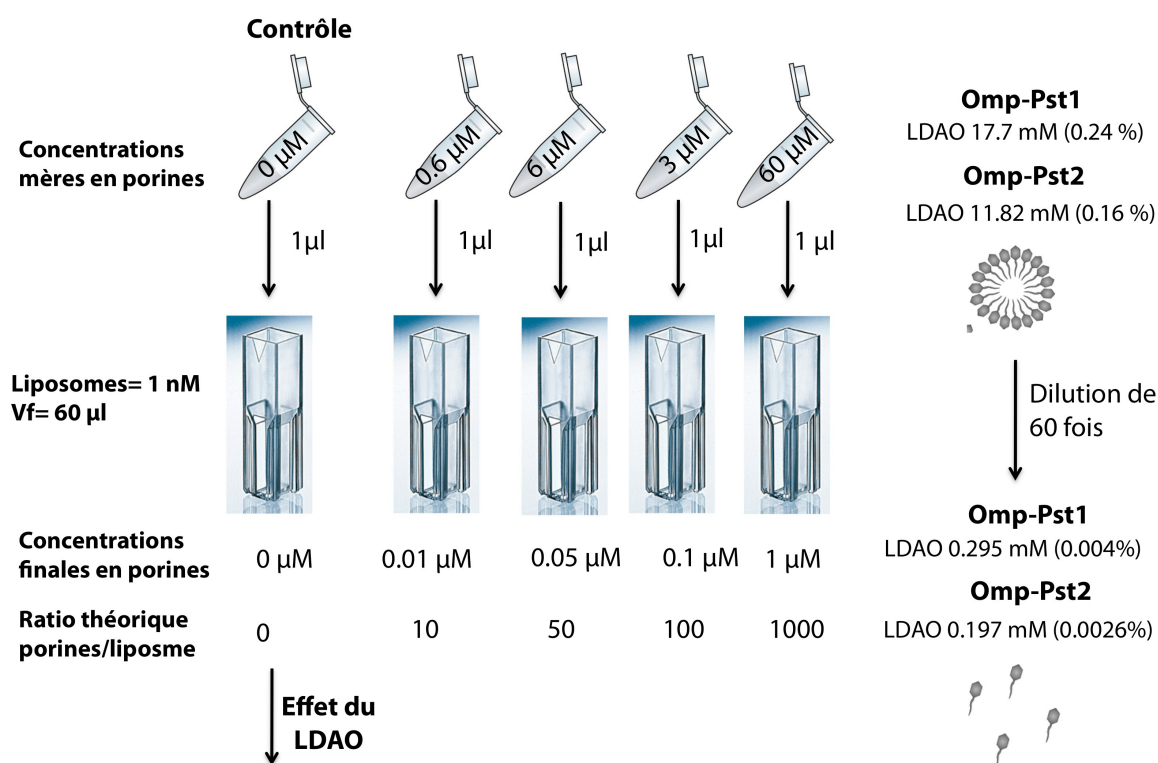


Figure 54: Approche d'incorporation des porines dans les liposomes par dilution au dessous de la CMC du détergent. Une illustration schématique de l'approche de dilution réalisée afin de suivre la cinétique d'agrégation des proteoliposomes par DLS. Le LDAO possède une CMC de 0.023 % (1.7 mM) en présence de NaCl¹³⁶. Suite à la dilution de porines de soixante fois en présence des liposomes préformés, la concentration finale en LDAO est estimée à 0.004 % (0.295 mM) pour Omp-Pst1 et 0.0026 % (0.197 mM) pour Omp-Pst2, respectivement.

En absence des porines

Afin de déterminer l'effet de la concentration en LDAO sur la stabilité des liposomes, nous avons mesuré la turbidité (densité optique à 400 nm) de solutions contenant 1 nM de liposomes de 50 nm de rayon, à différentes concentrations en LDAO⁹⁸. La figure 55 montre trois phases distinctes : la première se situe entre 0 et 6 mM de LDAO, où la turbidité reste stable avec une légère augmentation. Cette dernière signe que l'insertion de molécules de détergents dans les liposomes désorganise leur membrane et les fait gonfler. A partir de 6 mM, on observe une chute de la turbidité qui traduit la solubilisation des liposomes par les micelles de LDAO. A partir de 30 mM, la turbidité n'évolue plus, ce qui signe que tous les lipides sont passés de leur état lamellaire à un état hétéro-micellaire. Évidemment, la gamme de concentrations en LDAO dans laquelle les liposomes restent dans leur forme lamellaire dépend de la concentration en liposomes de départ; ici, nous avons montré qu'il faut 30 mM de LDAO pour solubiliser complètement 1 nM de liposomes de 60 nm de rayon. La taille moyenne des liposomes suivie par DLS confirme la transition entre les deux états lamellaire

et micellaire (entre 6 et 30 mM de LDAO). Celles ci montrent une transition dans la taille et l'homogénéité des liposomes entre 6 et 30 mM (Figure 55).

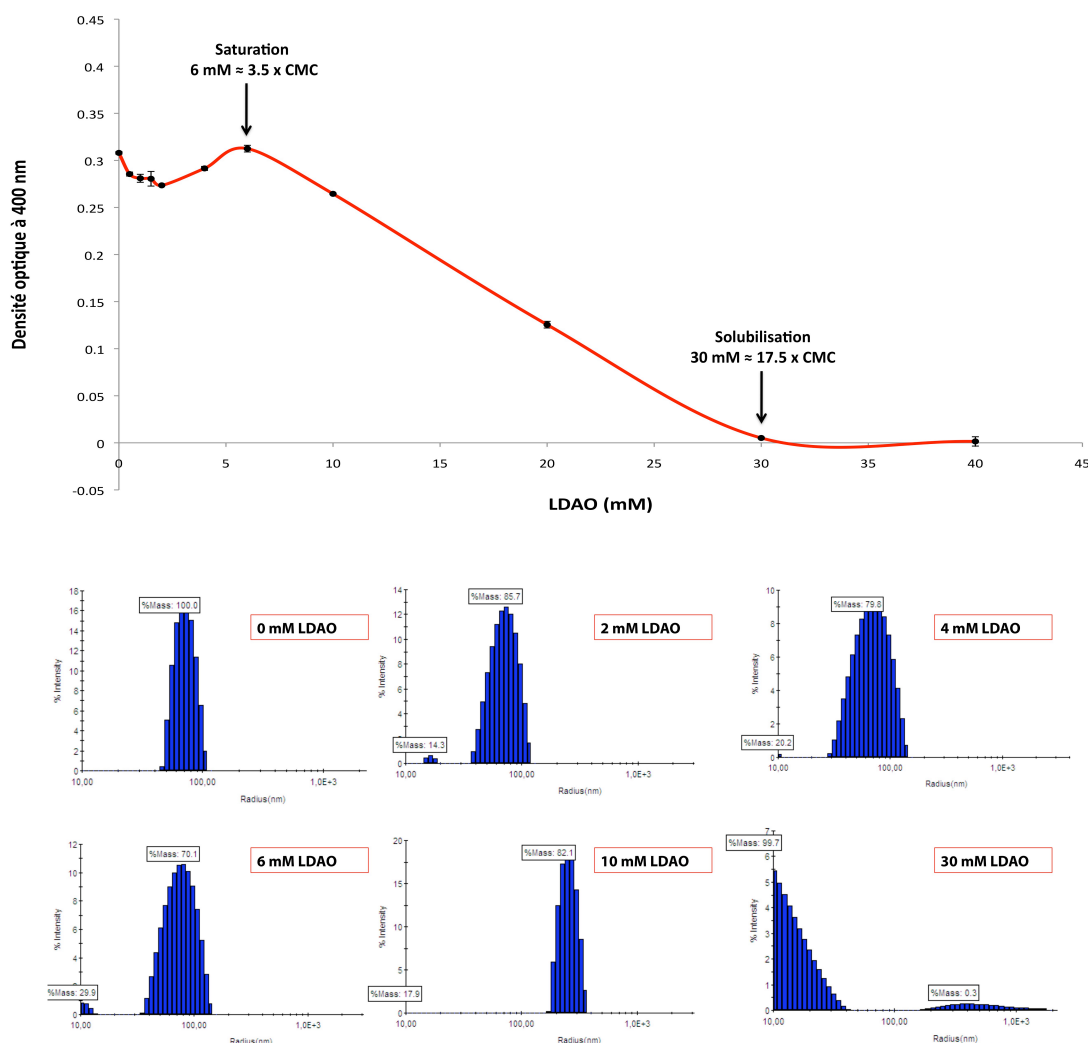


Figure 55: Evaluation de l'effet du LDAO sur la stabilité des liposomes. La turbidité d'une solution d'1nM de liposomes de 120 nm de diamètre a été réalisée en présence d'un gradient de concentration en LDAO. La concentration saturante des liposomes par les molécules de LDAO est estimée à 6 mM, et celle de solubilisation est 30 mM. En parallèle, l'état d'oligomérisation des liposomes en fonction du gradient de concentration en LDAO a été vérifié par DLS. Pour des concentrations inférieures à 6 mM en LDAO, les liposomes possèdent une taille de 100 à 120 nm de diamètre et gardent leurs stabilités. A une concentration en LDAO de 10 mM, la taille des liposomes augmente jusqu'à 200 nm puis décroît à des diamètres très faibles à partir de 30 mM de LDAO.

En présence des porines

En travaillant à pH 4, nous avons d'abord examiné la corrélation entre la taille de ces agrégats protéoliposomaux et le nombre de porines insérées par liposome. Comme le montre la figure 56, plus ce ratio porine/liposome est élevé, plus la taille desdits agrégats est importante. Ces résultats démontrent que le phénomène d'agrégation dépend de la « dose » de porines.

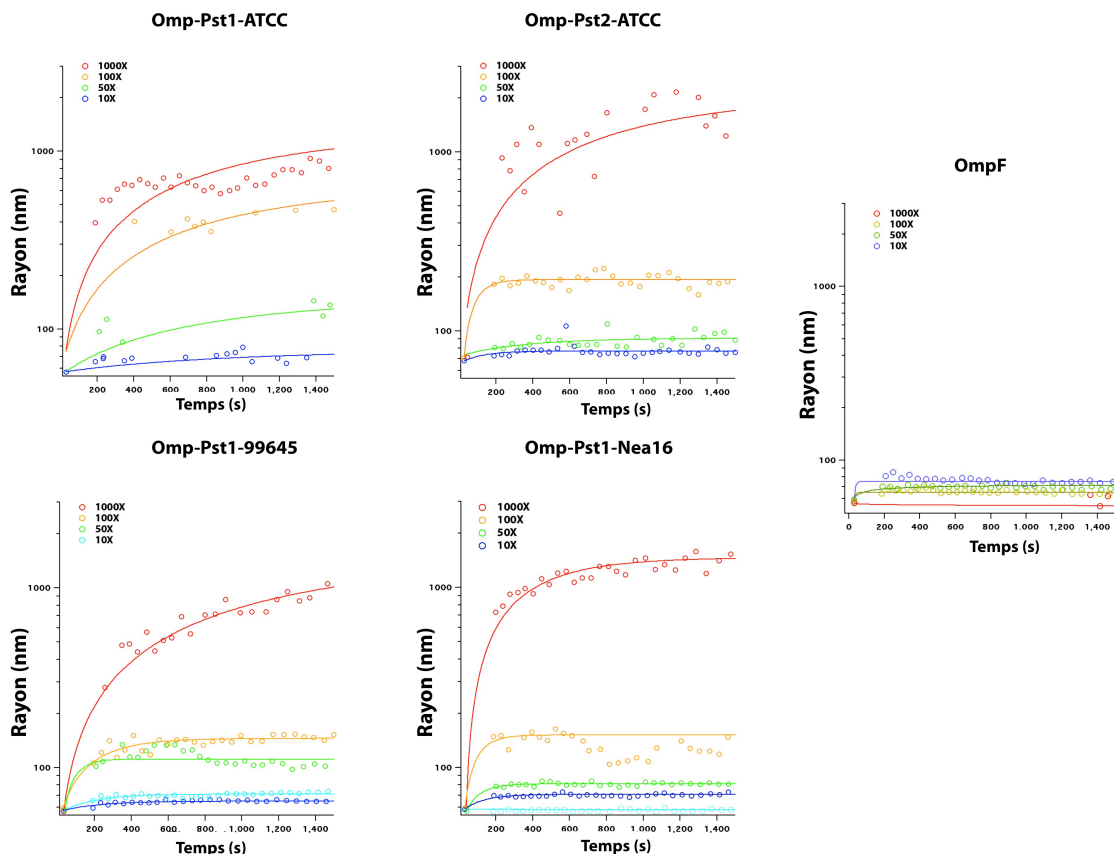


Figure 56: L'agrégation des protéoliposomes est favorisée par un ratio élevé des différentes porines de *P. stuartii* insérées à pH acide. Le rayon hydrodynamique des protéoliposomes est mesuré en fonction du temps avant ($t = 0$ s) et après ($0 < t < 1400$ s) l'insertion des porines dans la membrane liposomale. Au départ (à $t = 0$ s) les liposomes possèdent un rayon hydrodynamique de 60 nm. Différents ratio théorique de porines par liposome sont testés, 10X, 50X, 100X et 1000X et qui correspondent à des concentrations finales en protéines de 0.01, 0.05, 0.1 et 1 μ M, respectivement. Cette agrégation suit une cinétique du premier ordre. Toutes ces mesures sont effectuées à pH 4. OmpF est également représentée comme étant la porine contrôle de chez *E. coli*. Les courbes sont fittées (curve fitting) grâce au logiciel Igor.

Nous avons ensuite investigué le rôle du pH dans ce phénomène (Figure 57). Pour Omp-Pst1 et Omp-Pst2, la taille des agrégats obtenus à une concentration fixe de porines diminue à mesure que le pH augmente. Dans la mesure où nous avons déjà démontré que les constantes de dissociation des dimères de trimères sont indépendantes du pH, nous attribuons cette observation à une insertion plus productive des porines dans les membranes des liposomes à pH 4 qu'à pH 8 (étant entendu qu'une insertion productive correspond à l'orientation dans laquelle la porine expose ses boucles extracellulaires à la surface du liposome). La porine OmpF d'*E. coli*, utilisée comme contrôle, ne montre pas de telles propriétés d'adhésion (Figures 56, 57).

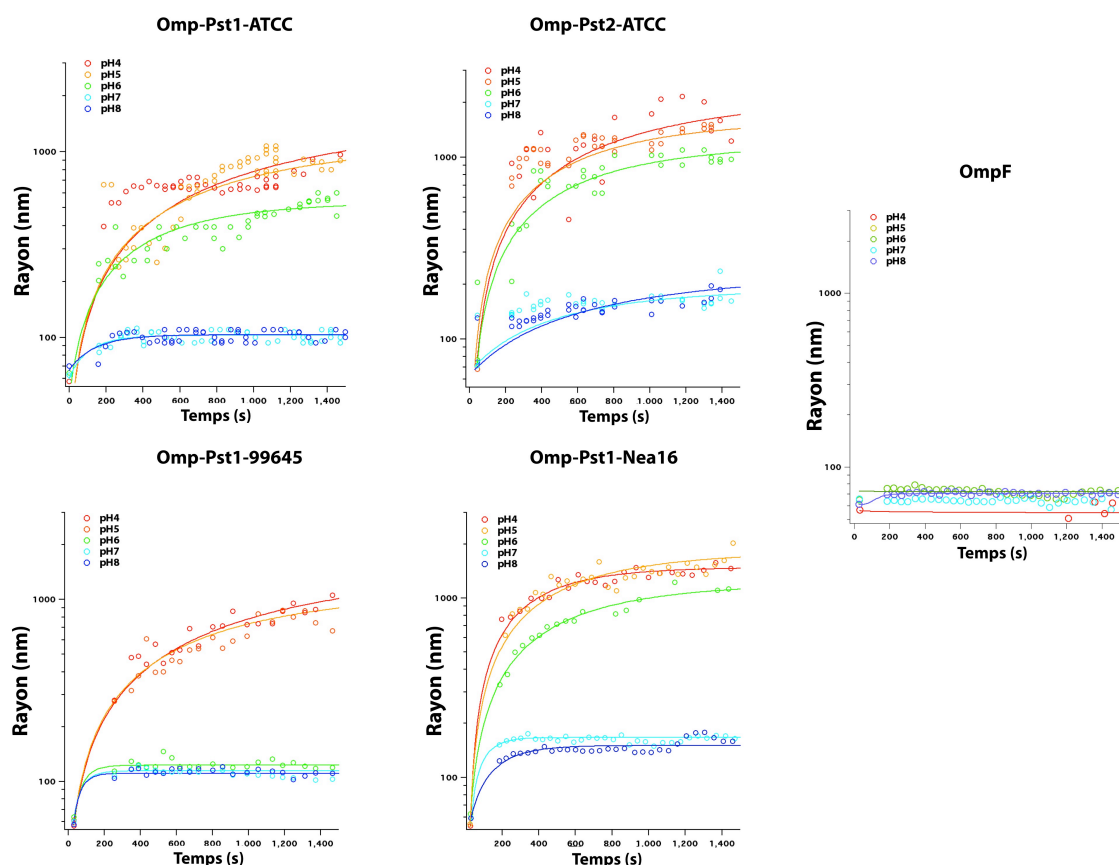


Figure 57: L'agrégation des protéoliposomes est favorisée à pH acide chez les différentes porines de *P. stuartii*. Le rayon hydrodynamique des liposomes est mesuré en fonction du temps avant ($t = 0$ s) et après ($0 < t < 1400$ s) l'insertion des porines dans leur membrane liposomale et pour un ratio théorique fixe de 1000 porines par liposome, soit une concentration finale en porine de $1 \mu\text{M}$. Au départ (à $t = 0$ s) les liposomes possèdent un rayon hydrodynamique de 60 nm. Différents pH sont testés (4, 5, 6, 7 et 8). Cette agrégation suit une cinétique du premier ordre. OmpF est également représentée comme étant la porine contrôle de chez *E. coli*. Les courbes sont fittées (curve fitting) grâce au logiciel Igor.

Afin de vérifier que les agrégats dont nous mesurons la taille par DLS contiennent bien des protéoliposomes, nous avons procédé à la séparation des constituants du mélange (liposomes, protéines et protéoliposomes) par centrifugation sur gradient de sucrose à pH 5 et 7, et à différents ratios théoriques de protéines par liposome – 10, 100 et 1000 X. Un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation est la différence entre la densité de la particule et celle du solvant. On peut moduler cette vitesse en faisant varier de façon continue cette différence de densité en créant un gradient de concentration. En biochimie des protéines, le sucrose est souvent utilisé à cause de sa densité élevée (1.59 g/cm^3). Dans cette approche, les liposomes vides s'immobilisent en haut du gradient (5% de sucrose), les protéines agrégées au fond du tube (30% de sucrose), et les protéoliposomes à un niveau intermédiaire au milieu du tube (10-20% sucrose). Pour suivre les différentes fractions présentes au sein du gradient, nous avons ajouté une sonde fluorescente, l'ANS (acide 8-anilino-1-naphthalenesulfonique), qui suite à son excitation dans le domaine de l'ultraviolet, émet dans le vert. Cette sonde se lie

aux portions hydrophobes des composés présents dans le milieu et permet donc de révéler les liposomes et les protéines. Nos résultats confirment la présence de protéoliposomes dans la gamme 10-20% de sucrose pour les ratios théoriques de 10, 100 et 1000 porines par liposome, et leur absence dans la même gamme en absence de porines (Figure 58). En addition, la fluorescence de l'ANS augmente en allant de 10 à 1000 porines par liposome. Ces observations sont en accord avec la *dose-dépendance* de la taille des agrégats protéoliposomaux sur la concentration en porines.

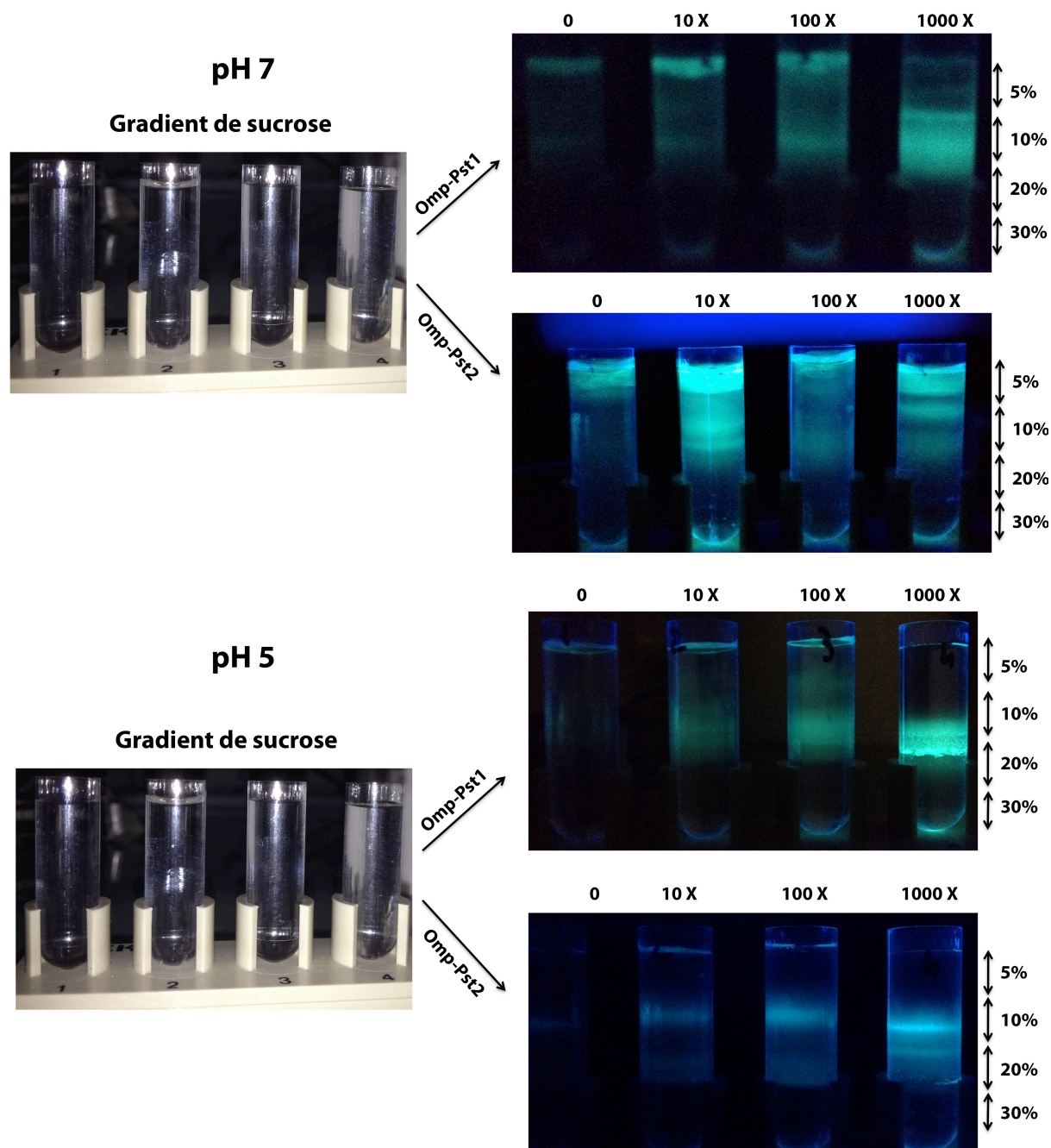


Figure 58: Séparation des agrégats protéoliposomaux sur un gradient de sucrose. L'image de gauche montre quatre tubes contenant les agrégats protéoliposomaux après centrifugation à 25 000 rpm sur gradient de sucrose. L'image de droite

montre ces tubes après illumination sous UV. Les différentes bandes correspondent à des populations différentes de liposomes, celles vides à 5 % de sucrose, les proteoliposomes dans une gamme de 10-20% de sucrose et les agrégats protéiques au fond du tube, à 30 % de sucrose.

Les différentes fractions présentes dans le gradient de sucrose ont été analysées par gel SDS PAGE. La figure 59 confirme l'insertion des porines au sein des liposomes pour Omp-Pst1 à pH 7. D'un côté, les fractions qui se situent entre 10 et 20% révèlent la présence de la protéine au sein des proteoliposomes (bandes f, g et h qui migre à la même masse moléculaire de la porine). L'intensité de ces bandes augmente selon le ratio théorique de 10, 100 et 1000 porines par liposome, ce qui est en accord avec notre interprétation précédente sur la corrélation entre le taux d'agrégation des proteoliposomes et la concentration en porines. D'un autre côté, l'analyse des fractions j, k et l montre qu'à pH 7, la majeure partie des porines ne s'insère pas dans les liposomes mais précipite plutôt. Ce résultat confirme que l'incorporation de porines dans les liposomes à pH 7 n'est pas optimale. L'analyse des bandes au pH acide reste requise afin de vérifier l'effet du pH sur le taux d'incorporation. Ces expériences sont en cours.

Omp-Pst1-pH7

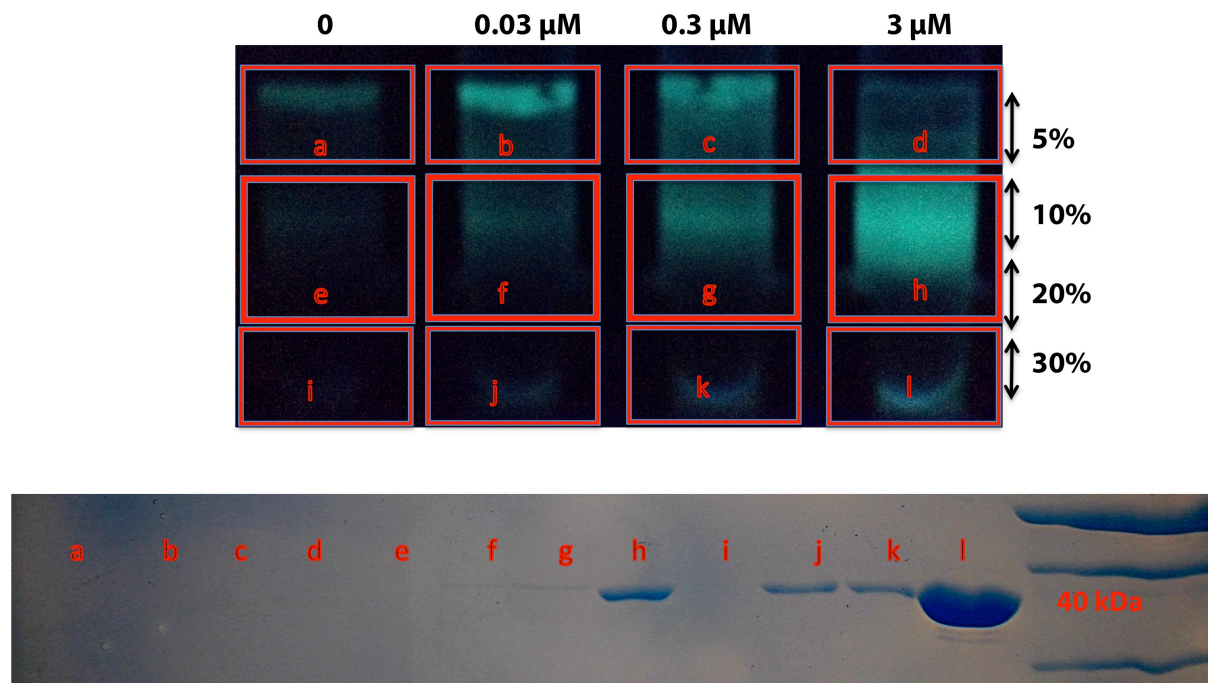


Figure 59: Fractions protéoliposomales séparées sur gradient de sucrose et suivies par gel SDS PAGE. Les différentes fractions séparées sur le gradient de sucrose après l'ajout d'Omp-Pst1 à pH 7 ont été pipetées délicatement puis concentrées (Amicon d'un « cut-off » de 30 kDa). Les échantillons ont été chauffés à 90 °C pendant 5 min puis déposées sur gel SDS PAGE 12%. Des bandes colorées au bleu de Coomassie ont été détectées uniquement pour les fractions f, g, h, j, k et l.

II-1.1.2: Imagerie des protéoliposomes en épifluorescence, MET et AFM

Afin d'imager l'agrégation des protéoliposomes induite par la présence d'Omp-Pst1 ou Omp-Pst2 dans leur membrane, ces derniers ont été marqués par l'introduction d'un lipide fluorescent dans leur composition. En raison de la résolution limitée de la microscopie optique, nous avons préféré travailler sur des liposomes géants (GUV), plutôt que sur des LUV de 60 nm de diamètre. Ainsi, la différence de taille et de structure des liposomes, avant et après insertion des porines, est plus visible sur nos micrographies (Figure 60). Pour une concentration en porines finale de 0.01 μM , l'agrégation des liposomes n'affecte pas leur forme ; ceux-ci restent donc sphériques. A des concentrations plus élevées en porines, de 0.1 et 1 μM , respectivement, on observe que l'agrégation des protéoliposomes entraîne la formation de larges structures planes. La concentration finale en LDAO après l'ajout des porines est estimée de 0.004 % pour Omp-Pst1 et 0.0026 % pour Omp-Pst2, soit bien en dessous de la CMC.

Afin d'obtenir plus d'informations sur ces structures, nous les avons observées en microscopie électronique en transmission après coloration négative (Figure 61). Pour ces expériences nous avons utilisé une taille de liposomes intermédiaires entre les liposomes utilisés en DLS (60 nm de diamètre) et les GUV utilisés en microscopie optique ($>1\mu\text{m}$), à savoir des LUV de 400 nm de diamètre. Afin d'explorer l'effet de la dose de porines de *P. stuartii* sur la forme des agrégats protéoliposomaux obtenus, nous avons réalisé nos expériences à plusieurs ratios de porines par liposome. Le phénomène d'agrégation est observé dès un ratio de 10 X pour Omp-Pst2, et 100 X pour Omp-Pst1. L'observation la plus surprenante est qu'à partir d'un ratio de 10000 porines/liposome, ces agrégats protéoliposomaux s'engagent dans la formation de structures ordonnées. Pour Omp-Pst1, il s'agit de cristaux 2D qui procèdent de l'empilement de couches lipidiques les unes sur les autres (Figure 61 E, J).

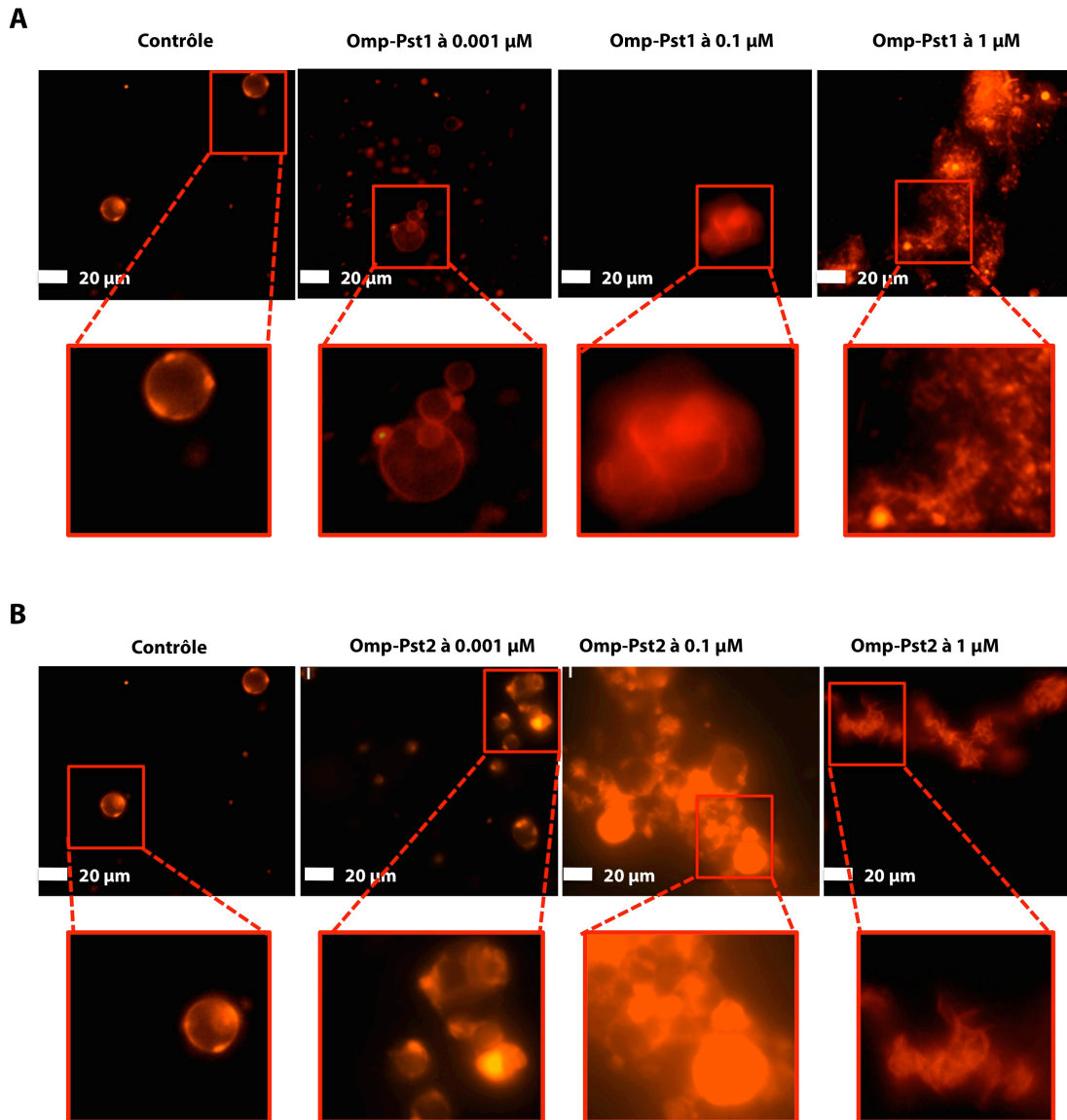


Figure 60: L'association et l'agrégation des liposomes géants (GUV) visualisées par microscopie d'épifluorescence suite à l'insertion des porines. L'association et l'agrégation des liposomes géants (GUV), marqués par des lipides fluorescents dans le rouge, sont imagées par épifluorescence, suite à l'insertion des porines sauvages d'Omp-Pst1 (A) et Omp-Pst2 (B), à différentes concentrations. Les GUV contrôles sont imagés avant l'ajout de porines.

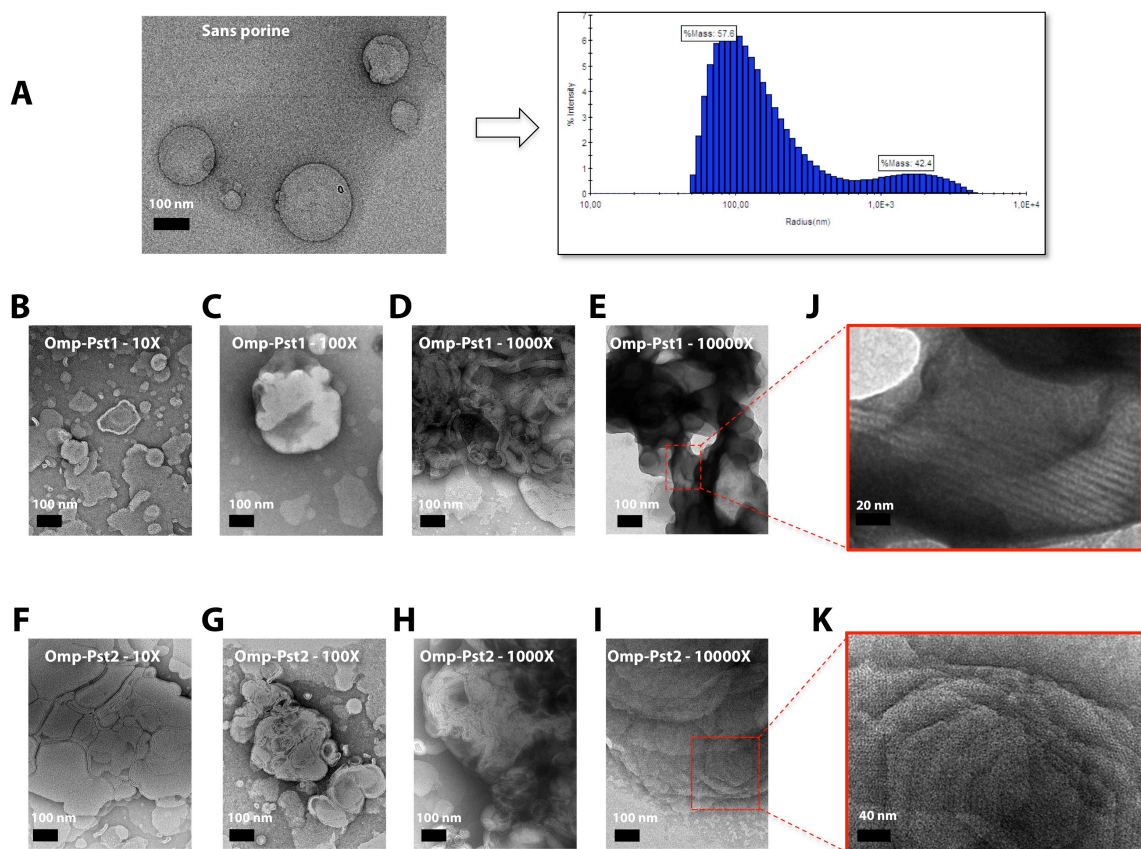


Figure 61: L'aggrégation des liposomes unilamellaires (LUV) est visualisée par microscopie électronique suite à l'insertion des porines. L'aggrégation des liposomes unilamellaires (LUV) est imagée par microscopie électronique en mode de transmission (MET) et après coloration négative, suite à l'insertion des porines sauvages d'Omp-Pst1 (B-J) et d'Omp-Pst2 (F-K). Les ratios d'Omp-Pst1 et d'Omp-Pst2 de (10X, 100X, 1000X et 10000X). Les LUV contrôles sont imagés avant l'ajout de porines et possèdent un diamètre de 400 nm. Cette taille est également vérifiée par DLS (A). Le grossissement des deux micrographes E (J) et I (K) sont également représentés.

Pour Omp-Pst2, ce sont des cristaux 2D empilés qui sont observés (Figure 61 I et K). Ainsi, la transformée de Fourier de l'image fournie en figure 62, et qui correspond à ces stacks de cristaux 2D, montre la signature d'un réseau hexagonal dans le plan de la membrane. Cette diffraction confirme la présence de notre protéine au sein de l'échantillon. De plus, des tâches régulièrement espacées de 50 Å d'intervalle tout le long de l'axe vertical du cliché sont également observées (Figure 62 C, D). Nous attribuons la présence de ces tâches à la contribution des multicouches lipidiques. Par là même, nos résultats confirment la nature cristalline des proteoliposomes formés en présence d'Omp-Pst2.

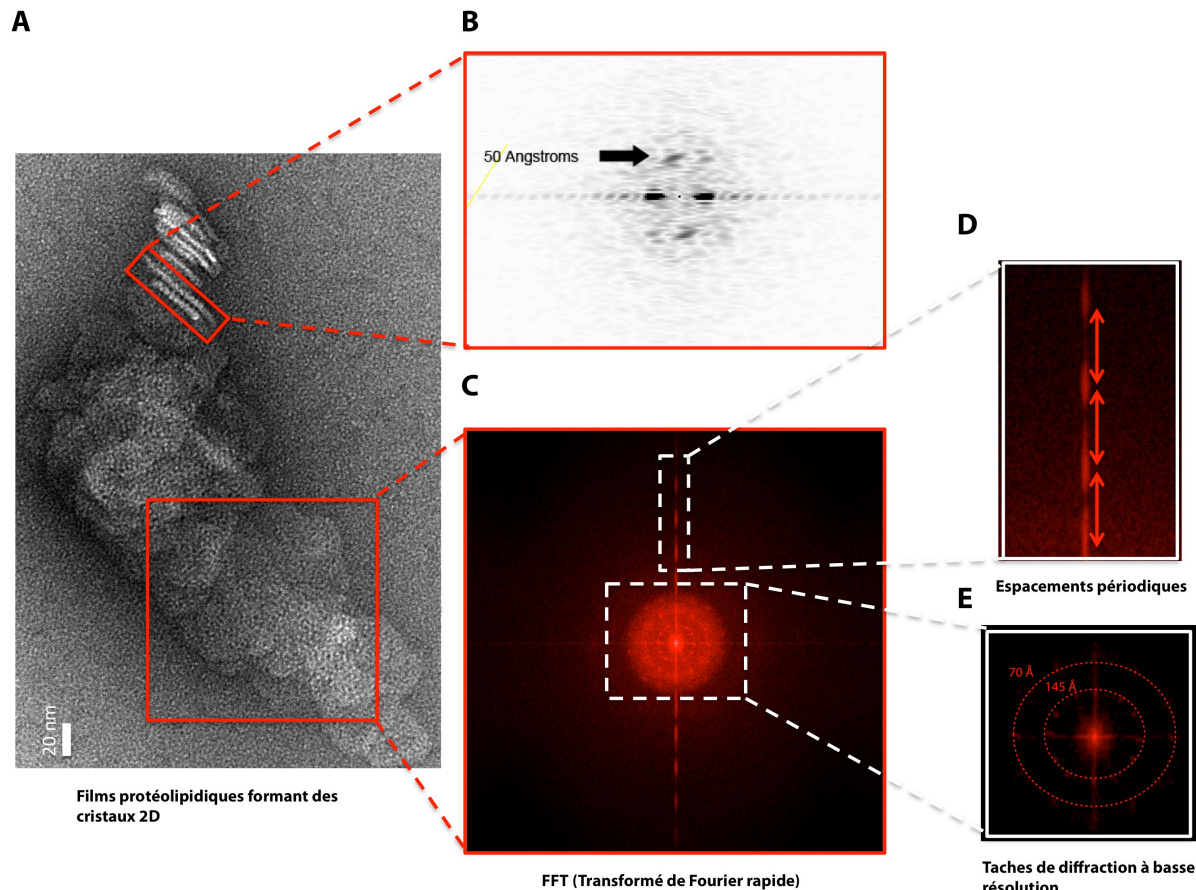


Figure 62: L'insertion d'Omp-Pst2, à des concentrations élevées, génère la formation de films protéolipidiques cristallins caractérisés par TEM. A/ Micrographe des films protéolipidiques cristallins, visualisé en TEM, suite à l'ajout d'Omp-Pst2 à un ratio de 10000X par liposome unilamellaire (LUV). B-C/ La transformée de Fourier rapide (FFT) des quadrants en rouge indiqués en A, montre des taches de diffraction à basse résolution. D-E/ Les taches qui sont présentes tout le long de l'axe vertical, et qui se répètent de façon régulière, sont imputées aux espacements entre les films lipidiques (D), alors que celles qui suivent une symétrie hexagonale, notamment à 145 et 70 Å de résolution, sont attribuées aux protéines présentes au sein des films lipidiques (E).

Un des paramètres de maille mesuré est égal à 145-150 Å. Les taches observées à 70 Å signent pour le deuxième ordre de diffraction le long de cette direction. Dans le cristal utilisé pour résoudre la structure, deux paramètres de maille sont d'environ 145-150 Å: un qui correspond à deux dimères de trimères liés par une symétrie cristallographique d'ordre $P2_1$ et un autre qui correspond à l'espacement latéral entre ces deux dimères (Figure 62 B). Il est donc possible d'imaginer deux cas de figures dans les cristaux spontanément formés en présence des liposomes ; un premier dans lequel la symétrie $P2_1$ n'est pas conservée, et où cet espacement correspond donc à deux trimères de porines associés latéralement ; et un deuxième dans lequel cette symétrie est présente comme dans le cristal 3D. On observe également des taches de diffraction périodique de 50 Å le long de l'axe vertical du cliché, suggérant qu'un espacement de 50 Å est reproduit dans les cristaux 2D. Nous interprétons ce paramètre comme la signature de l'espacement des membranes superposées par l'addition

d'Omp-Pst2. La transformée de Fourier d'une zone montrant clairement un empilement membranaire est en faveur de cette hypothèse. Nous proposons donc les deux modèles A et B en figure 63 C comme pouvant expliquer la formation d'agrégats cristallins de protéoliposomes en présence d'Omp-Pst2.

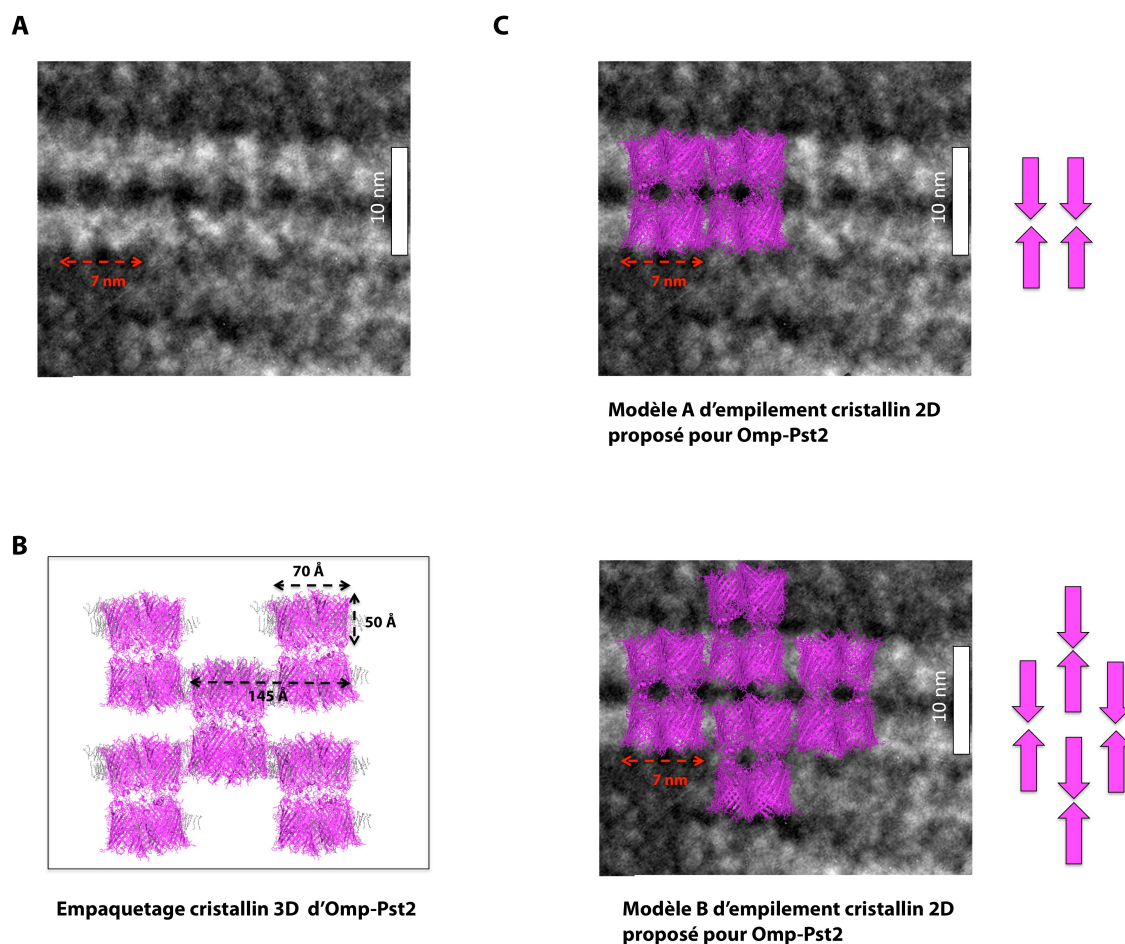


Figure 63: Modèle de l'interaction hexamérique face à face d'Omp-Pst2 insérée dans une bicouche membranaire. A/ Micrographe de l'interaction, face à face, entre deux rangées d'Omp-Pst2 insérées dans une bicouche membranaire. B/ L'empilement 3D d'Omp-Pst2, dont la structure a été résolue à 2.2 Å de résolution, montre que les porines, colorées en magenta, suivent une symétrie monoclinique $P2_1$. Les dimensions d'Omp-Pst2, retranscrites par des flèches en pointillés noirs, sont déterminées grâce au logiciel Pymol. C/ Deux modèles (A et B) sont proposés pour illustrer l'empilement des hexamères d'Omp-Pst2 (colorés en magenta), dans les cristaux 2D protéoliposomaux. Les hexamères d'Omp-Pst2 sont placés directement sur le micrographe représenté en A. Les flèches colorées en magenta représentent une vue schématisée des porines d'Omp-Pst2 où la pointe correspond à la partie extracellulaire (boucles extracellulaires).

Afin de vérifier si ces cristaux se forment dans d'autres conditions en solution, et non pas seulement à cause de leur absorption sur les grilles de microscopie électronique ou de l'ajout d'acétate d'uranyle, nous avons reproduit ces expériences en utilisant la microscopie à force atomique. Nous n'étions cependant capable d'avoir des images de résolution utile qu'après séchage des échantillons sous vide. Les images obtenues ont permis de confirmer la nature cristalline de l'échantillon, tant en ce qui concerne le plan de la membrane que l'empilement

des membranes (Figure 64). L'espacement entre les différentes couches juxtaposées est de 5 nm et il est consistant avec la taille d'une membrane (Figure 64 A). La figure 64 B montre également des répétitions périodiques sur la couche superficielle des cristaux bidimensionnelles et qui pourront être assignées au diamètre des porines situées les une à côté des autres, de 7 nm chacune. Il est cependant difficile de pouvoir déterminer l'orientation des porines (coté extracellulaire ou intracellulaire). Il est peu probable que ces larges structures planes, qui s'étalent sur des centaines de nanomètres de largeur, sont des agrégats protéiques. Cela reste néanmoins une possibilité que nous tenterons à l'avenir de confirmer ou infirmer en utilisant des marqueurs spécifiques de lipides.

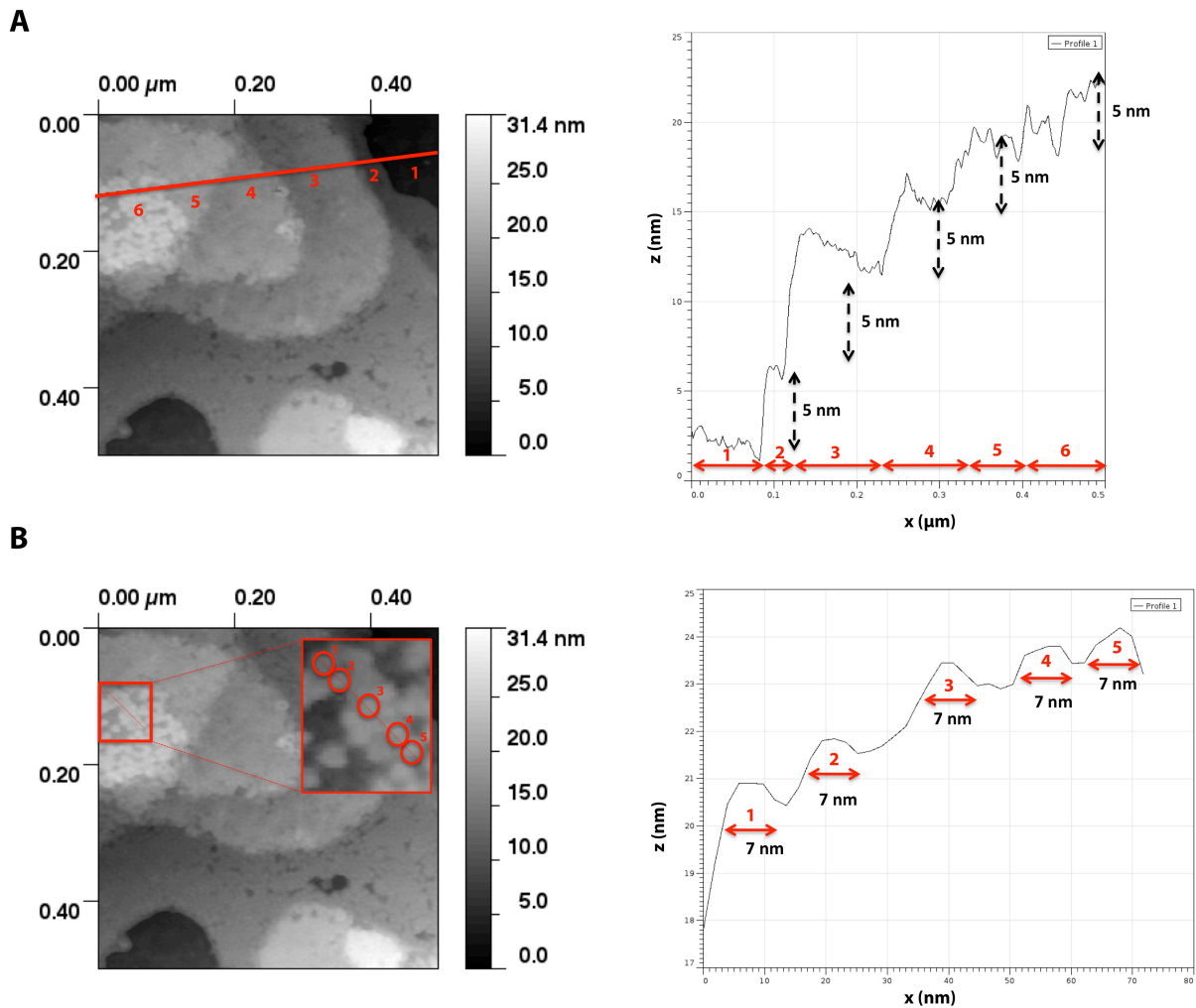


Figure 64: L'image topographique des films protéolipidiques cristallins prise par microscopie à force atomique (AFM). A/ L'image topographique représentée montre plusieurs couches juxtaposées au sein des cristaux bidimensionnels et séparées de 5 nm comme mesuré par le logiciel Gwyddion B/ Une trace sur la couche superficielle, montre des répétitions périodiques qui pourront être assignées au diamètre d'une porine (7 nm). Il est cependant difficile d'attribuer une orientation précise aux porines à la résolution actuelle de l'image.

II-1.2: Rôle des porines dans la communication intercellulaire *in vitro*

Les structures hexamériques des porines laissent supposer un rôle dans l'adhésion et dans la communication intercellulaires. Les expériences menées jusqu'ici ont permis d'étayer la première hypothèse mais rien n'a encore été démontré concernant la seconde. Afin de déterminer si des molécules peuvent transiter au travers des dimères de trimères d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2, nous avons réalisé une expérience, dans laquelle une population de liposomes « rouges » du fait de la présence dans leur composition d'un lipide fluorescent est mélangée à une population de liposomes « verts » du fait de la présence de fluorescéine dans leur lumen (Figure 65 A). En l'absence des porines, les liposomes ne s'agrègent pas et il n'y a pas de colocalisation de la fluorescence après 30 min, indiquant que l'effet des fuites à travers ces porines est mineur (toutes les molécules fluorescentes qui sortent des liposomes voient leur fluorescence diluée dans le milieu extérieur) (Figure 65 B, F). En présence de porines, la colocalisation des fluorescences rouge et verte est observée après 30 min d'incubation (Figure 65 C-E, G-I). Ceci démontre que les dimères de trimères de porines peuvent servir (directement ou indirectement) au transfert de petites molécules entre compartiments et donc très probablement, à la communication intercellulaire.

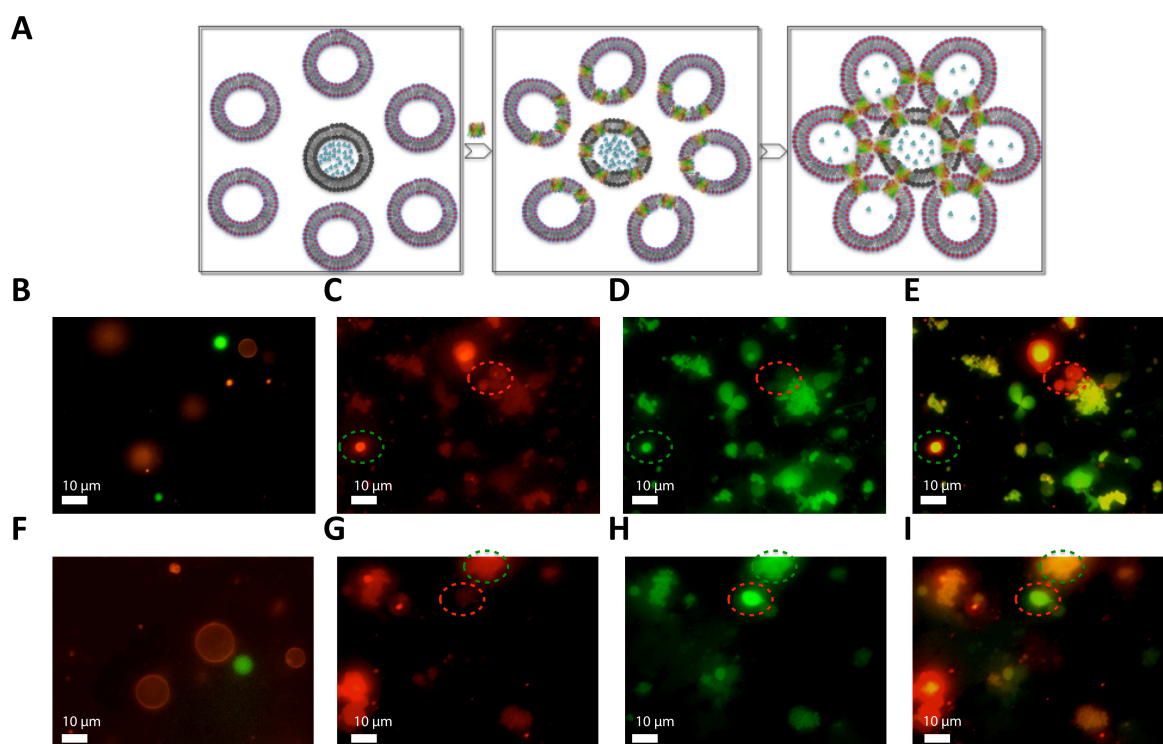


Figure 65: Transfert de la fluorescéine entre deux populations de liposomes géants *via* Omp-Pst1 et Omp-Pst2. A/ Un modèle illustrant l'expérience de transfert de la fluorescéine entre deux populations différentes de liposomes géants. Une population contenant des liposomes vides marqués dans leur membrane externe par un lipide fluorescent rouge et une deuxième population contenant des liposomes non marqués mais encapsulant la fluorescéine observable en vert. B, F/ L'image de deux populations de liposomes mélangées avant l'ajout des porines est prise suite à l'excitation des deux

fluorophores (la fluorescéine et les lipides fluorescents) en même temps. La concentration finale des porines correspond à 0.01 μ M. Les images E et F correspondent à la superposition des deux images (C, D) et (G, H) respectivement. Cette superposition révèle des liposomes qui émettent de la fluorescence dans le rouge et le vert et sont indiqués par des cercles en pointillée vert contrairement à d'autres qui ne fluorescent que dans une des deux couleurs et sont indiqués par des cercles en pointillée rouge.

II-1.3: Étude fonctionnelle des propriétés adhésives des porines *in vivo*

Dans la partie précédente, nous avons montré que les propriétés auto-associatives d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 peuvent être observées *in vitro*. Cependant, le fait que ces interactions aient lieu au niveau cellulaire n'est pas encore prouvé. Afin de déterminer si l'auto-association des porines joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, nous avons utilisé deux systèmes bactériens, *P. stuartii* et *E. coli*. Le premier nous permettra de valider les propriétés adhésives des porines au sein de l'organisme qui les exprime, sans avoir recours aux techniques de modifications génétiques. Le deuxième modèle, est une souche d'*E. coli* déletée pour les porines majeures de cette espèce, OmpF, OmpC, OmpA et LamB. Cette souche, nommée Δ omp8, permettra de vérifier l'effet d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 spécifiquement et indépendamment des contributions d'autres mécanismes spécifiques à *P. stuartii* ou aux porines d'*E. coli*. Pour simplifier la suite de la lecture, les deux souches *E. coli* Δ omp8 exprimant Omp-Pst1 et Omp-Pst2 seront nommées B1 et B2, respectivement.

Avant de caractériser les propriétés adhésives des porines chez *P. stuartii*, il nous paraissait capital de connaître l'identité de la porine exprimée majoritairement dans sa membrane externe. Pour cela, nous avons eu recours à la spectroscopie de masse. L'approche employée a consisté à faire migrer le lysat d'extrait de membrane sur un gel SDS Page, après avoir fait pousser les bactéries dans un milieu de culture. Les bandes correspondantes aux porines furent isolées sur le gel, puis incubées en présence de trypsine. Les peptides résultant de la digestion furent ensuite analysés par la technique MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight). L'identité des protéines fut ensuite déduite des recouvrements des séquences de ces peptides avec les prédictions fournies par la base de données NCBI (logiciel MASCOT). Les résultats obtenus montrent qu'Omp-Pst1 est la porine majoritairement exprimée dans la membrane externe de *P. stuartii* en milieu de culture classique (LB). Nous avons vérifié que cela était également le cas quand *P. stuartii* pousse en urine artificielle, *i.e.* un milieu proche de celui dans lequel elle baigne en conditions pathologiques (Figure 66).

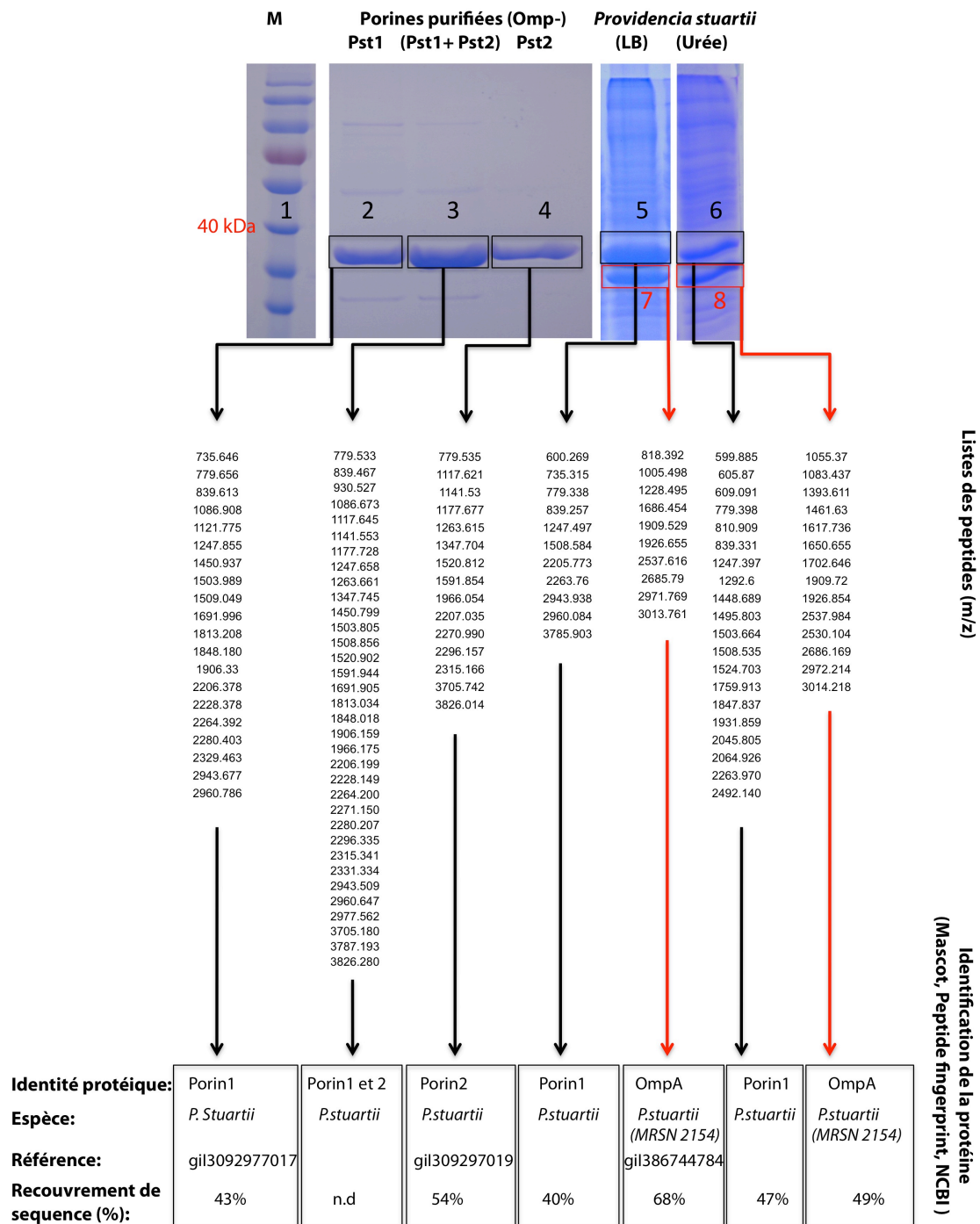


Figure 66: Identification de l'identité protéique “in gel” par spectrométrie de masse. Le gel SDS 10% polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie montre la présence des bandes de porines (quadrants noirs) migrant à 40 kDa après chauffage de l'échantillon en comparant avec le marqueur de poids moléculaire indiqué sur le gel par le numéro 1. Les bandes 2, 3 et 4 correspondent aux solutions de porines purifiées au préalable et migrées selon le pourcentage massique suivant Omp-Pst1 à 100% (1), mélange d'Omp-Pst1 et d'Omp-Pst2 à 50% (2) et Omp-Pst2 à 100% (3). Les bandes (5, 7) et (6, 8) correspondent aux bandes obtenues à partir des lysats cellulaires de *P. stuartii*, après mise en culture des bactéries dans des milieux LB et urée, respectivement. Toutes les bandes indiquées dans les quadrants sont soumises à une digestion à la trypsine. Les peptides générés sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse. L'identification de l'identité protéique est effectuée en ligne (Mascot, Peptide finger print) sur la base de donnée NCBI.

Il est connu que ces bactéries peuvent vivre en communauté multicellulaire nommée

biofilms. Il est également admis qu'au sein de ces communautés, différentes espèces peuvent coexister. Les cellules y sont enchâssées dans une matrice polymérique composée essentiellement d'oligosaccharides, mais aussi d'ADN et d'amyloïdes. Si les propriétés d'auto adhésion d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 sont pertinentes physiologiquement, elles pourraient servir à la genèse des biofilms en permettant de maintenir les premières cellules proches les unes des autres, avant que la matrice ne soit synthétisée. Aussi, Omp-Pst1 et Omp-Pst2 pourraient servir la communication interbactérienne ou « quorum sensing », soit par un transfert direct des solutés de cellule à cellule, soit par une augmentation de la concentration locale en soluté. Dans notre investigation de la participation d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 à la formation de biofilms, nous avons eu recours à différentes méthodes d'imageries, notamment les microscopies d'épifluorescence et électronique. Dans les paragraphes qui suivent, nous décrirons d'abord les résultats obtenus sur les biofilms intersticiels (2D), puis ceux obtenus sur des biofilms tridimensionnels (3D).

II-1.3.1: Biofilms intersticiels (2D)

Les biofilms intersticiels se développent lorsque des micro-organismes s'attachent et s'étendent sur une surface solide nutritionnelle sous forme d'une monocouche cellulaire en recrutant d'autres cellules pour augmenter leur densité cellulaire¹³⁷. Dans ce type de biofilms, les cellules sont rendues mobiles grâce à un mécanisme appelé « twitching motility »¹³⁸. Ce mécanisme recrute différentes composantes cellulaires telle que les pili de type IV, des structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à Gram-négatif. Ces structures permettent plus particulièrement des mouvements à l'interface des surfaces solides.

Nous avons pu obtenir des biofilms intersticiels qui poussent directement sur les grilles métalliques recouvertes d'un film de carbone, adaptées à la microscopie électronique (Figure 67 A). Après coloration négative, les micrographes obtenus par microscopie électronique révèlent des monocouches cellulaires pour les bactéries B2, dans lesquelles les cellules s'adhèrent les unes aux autres (Figure 67 B, C). De façon remarquable, le grossissement sur l'interface de contact entre deux bactéries B2 révèle un diamètre de 10 nm sur la largeur des deux membranes externes superposées une distance consistante avec notre modèle des cristaux 2D d'Omp-Pst2 (Figure 67 D). Ce résultat est en faveur d'un rôle potentiel des porines dans l'adhésion intercellulaire au sein de ces biofilms. Notons que des cellules espacées les une des autres, et entourées d'un matériel de nature filamenteuse, ont été

également observée au sein de ces biofilms (Figure 67 E, F). Il est probable que le matériel entourant les bactéries représente un début de la sécrétion de la matrice d'exopolysaccharide au sein de ces biofilms 2D. Cette observation montre que ce phénomène d'adhésion entre les bactéries n'est pas homogène sur toute la surface colonisée. Les expériences sur les autres souches bactériennes (B1 et *P. stuartii*) sont toujours en cours.

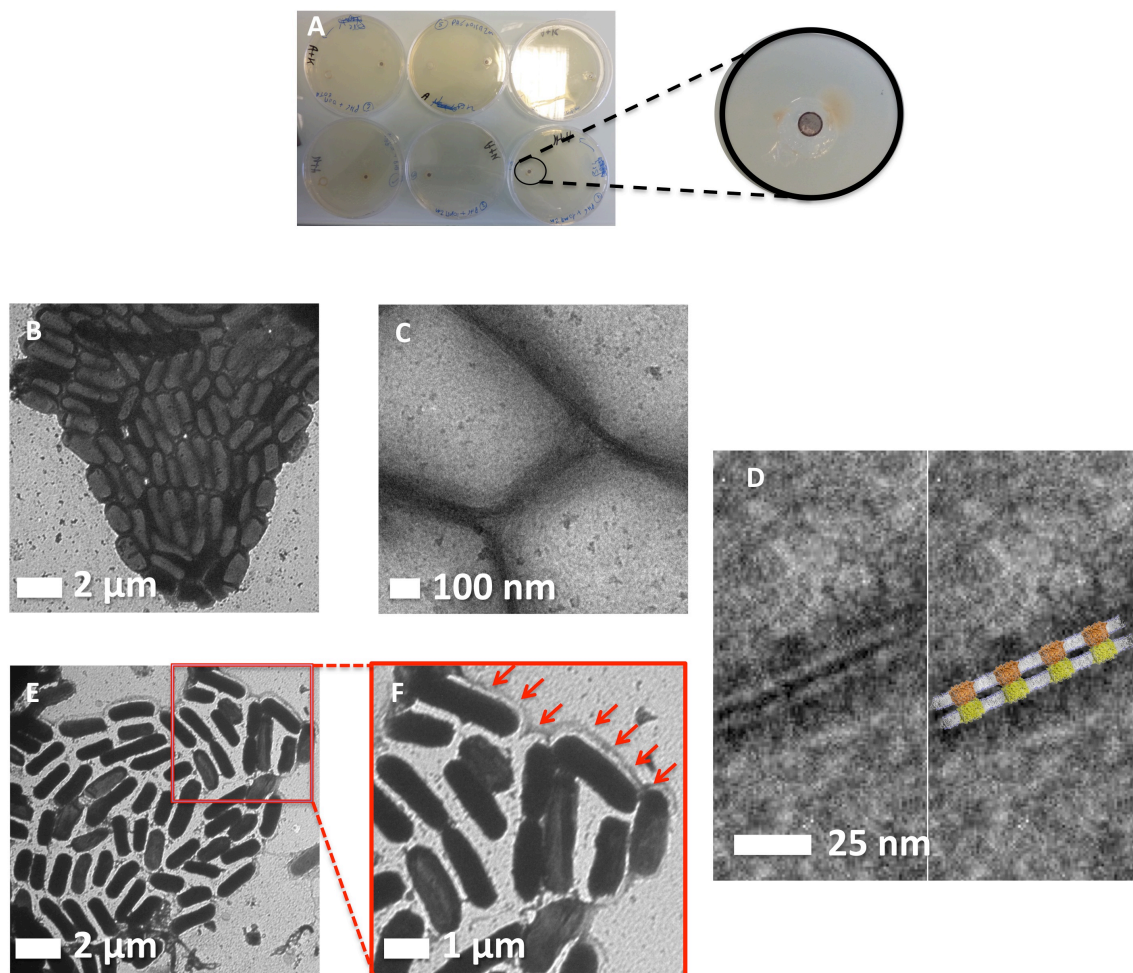


Figure 67: Images obtenues par microscopie électronique en coloration négative sur des bactéries d'*E. coli* exprimant Omp-Pst2, au sein d'un biofilm interstitiel (2D). A/ L'approche employée pour obtenir des biofilms interstitiels consiste à faire pousser les bactéries sur des grilles métallique recouverte d'une couche de carbone. Ces grilles sont placées dans des boîtes de pétri puis incubées en présence des bactéries pendant 4 heures à 37 °C. Les grilles sont ensuite colorées à l'acétate d'uranyle à 2% pendant 5 minutes. B/ Micrographe d'une monocouche bactérienne B2, les bactéries s'adhèrent les unes aux autres. C/ Grossissement d'une zone d'interaction impliquant quatre bactéries B2 en contact direct. D/ Un grossissement de la zone d'interface membranaire entre deux bactéries B2. Les deux membranes externes sont facilement observables. La même image est représentée deux fois, à gauche l'image brut et à droite en présence du modèle cristallographique d'Omp-Pst2 inséré au sein d'une bicouche lipidique artificielle. Ce modèle est parfaitement placé dans l'interface de contact membranaire mimant cette interaction. E-F/ les micrographes montrent des bactéries espacées les unes des autres. Les flèches en rouges indiquent la présence d'une structure filamenteuse enrobant ces bactéries.

II-1.3.2: Biofilms tridimensionnels (3D)

Des biofilms plus complexes et de grande taille peuvent se développer pour former une structure à quatre dimensions (X, Y, Z et le temps). Ces biofilms sont considérés comme

mature et ont déjà secrété la matrice d'exopolysaccharide. Afin de vérifier si les bactéries s'adhèrent les unes aux autres au sein de ces biofilms, nous avons eu recours à deux types de microscopies, la microscopie d'épifluorescence et la microscopie électronique.

La microscopie d'épifluorescence a été utilisée, dans un premier temps, pour vérifier la présence de ces biofilms en solution *i.e.* en les gardant dans leur milieu de culture au moment de l'acquisition des images. Nous avons donc marqué l'ADN des différentes bactéries B1, B2 et *P. stuartii* avec un agent fluorescent diffusible, et les avons observées par microscopie d'épifluorescence. Nos résultats confirment la présence des gros agrégats cellulaires qui se forment dans les trois dimensions de l'espace, jusqu'à des tailles de l'ordre des centaines de microns. Les cellules semblent s'agencer les unes à proximité des autres au sein des trois biofilms bactériens illustrés dans la figure 68 (B1, B2 et *P. stuartii*).

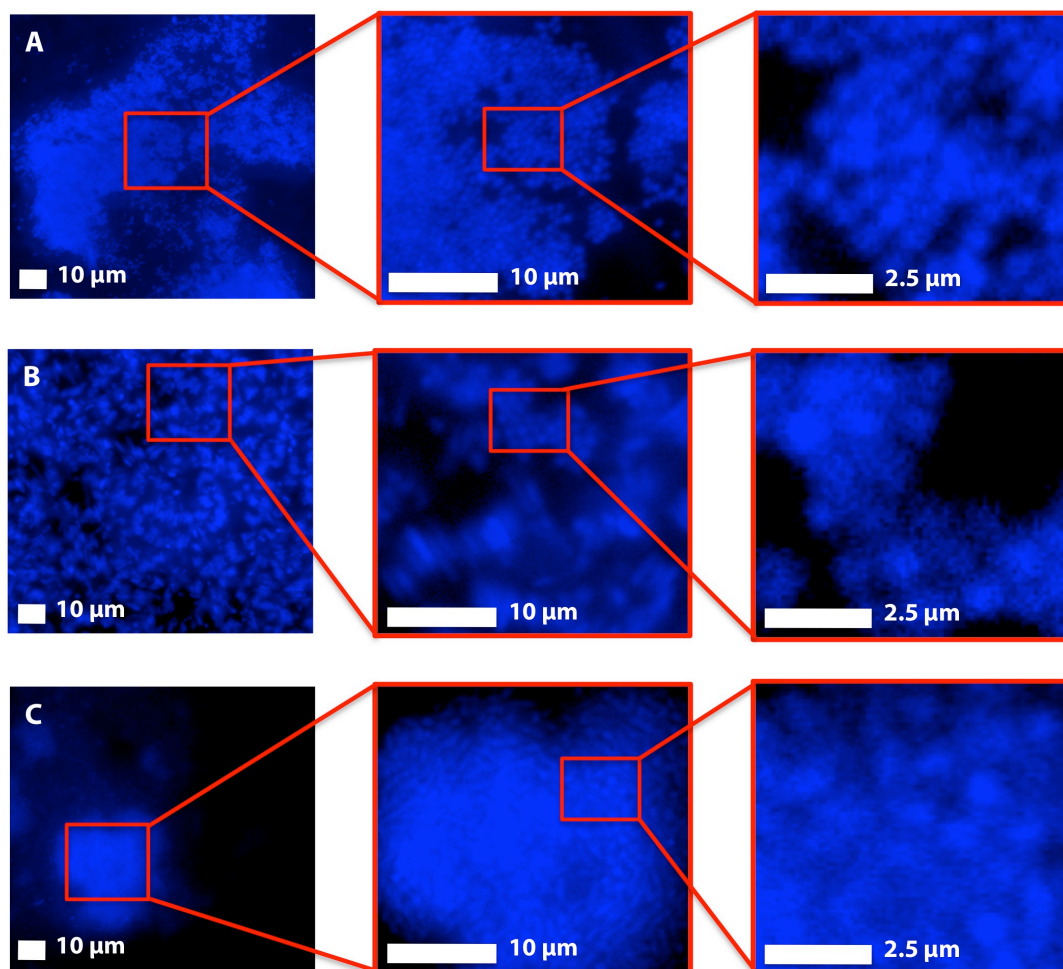


Figure 68: Images obtenues par microscopie d'épifluorescence sur des bactéries B1, B2 et *P. stuartii* au sein d'un biofilm 3D. A-C/ Les bactéries B1 (A), B2 (B) et *P. stuartii* (C) sont mises en culture sur des surfaces solides (lames de verre), dans une enceinte thermostatée à 37 °C, au cours de l'acquisition des images. Les images obtenues montrent ces différentes s'adhèrent les unes à proximité des autres au sein du biofilm 3D. Ces bactéries sont marquées au Hoechst, un

agent fluorescent qui s'intercale à l'ADN et qui fluoresce dans le bleu (Ex: 346 nm ; Em: 497 nm). Les images sont prises à plusieurs grossissements.

Afin de vérifier si les bactéries entrent en contact au sein des biofilms 3D, nous avons eu recours à des coupes ultrafines en microscopie électronique. Les micrographes obtenus sur B1, B2 et *P. stuartii* ne révèlent aucun contact intercellulaire entre les bactéries au sein de ces biofilms (Figure 69). Ces micrographes révèlent également la présence des structures filamenteuses entourant les bactéries. La vérification de leur nature étant en cours, il est probable que ces filaments font parties des composantes de la matrice d'exopolysaccharide du biofilm.

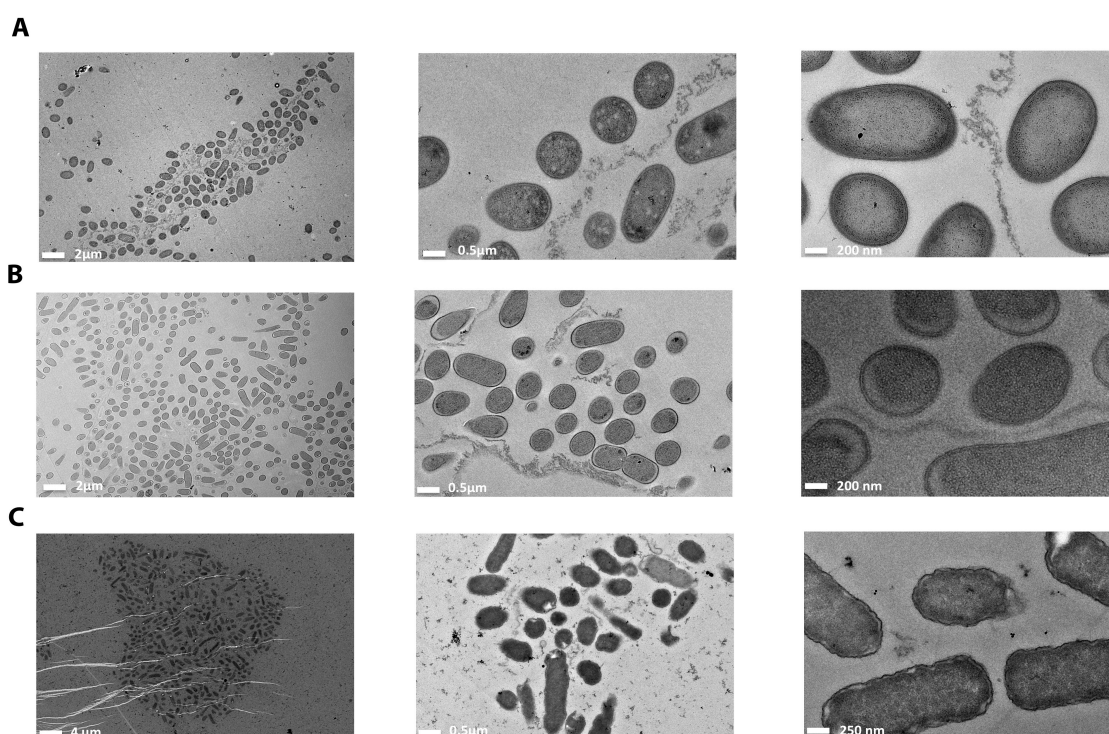


Figure 69: Images obtenues par microscopie électronique après coupes ultrafines sur des bactéries d'*E. coli* exprimant les porines d'intérêt et la souche de *P. stuartii* au sein d'un biofilm mature. A-B/ Les micrographes sont obtenues par microscopie électronique après coupes ultrafines de 80 nm d'épaisseur sur des biofilms bactériens matures de B1 (A) et B2 (B). L'approche expérimentale consiste à figer les bactéries au sein du biofilm par cryocongélation à haute pression (2000 bar). C/ Les micrographes sont obtenus par microscopie électronique après coupes ultrafines de 80 nm d'épaisseur sur des biofilms bactériens de *Providencia stuartii*. Ces bactéries ont été figées différemment des B1 et B2 par l'ajout d'un fixateur qui interagit chimiquement avec eux. Suivant les deux approches, aucun contact membranaire entre les cellules n'a été identifié.

La rareté des phénomènes d'adhésions intercellulaires observés au sein d'un biofilm 3D (mature), contrairement à ce qui a été observé au sein d'un biofilm 2D, suggère une potentielle influence de la matrice d'exopolysaccharide. Celle-ci pourra rendre la présence des bactéries les unes à proximité des autres défavorable ou même inutile au sein d'un biofilm.

Afin de confirmer cette hypothèse, il est important de soulever la relevance de la présence (ou l'absence) d'une telle matrice au sein du biofilm d'un point de vue physiologique. Notre interprétation est que les bactéries dans des stades précoces du développement d'un biofilm (avant la sécrétion de la matrice) ont besoin d'adhérer les unes aux autres afin de se regrouper sous forme de micro-colonies. Nos données suggèrent qu'une telle adhésion est médiée par les porines et les proposent comme acteurs principaux dans la genèse du biofilm. Par ailleurs, nos données pointent également vers un rôle potentiel des porines dans la communication intercellulaire. Il est possible d'imaginer qu'un échange direct des signaux s'établit entre les bactéries à ce stade du développement du biofilm *via* les canaux des porines. Ce mécanisme ne serait plus nécessaire aux stades avancés de développement d'un biofilm (3D), dans lesquels la matrice extracellulaire prend le relais dans l'établissement des deux rôles d'adhésion et de communication entre les bactéries. Ces bactéries communiquent par une voie indirecte en produisant de phéromones diffusibles à travers la matrice grâce au mécanisme de « quorum sensing »^{69, 70, 139}. En addition, les bactéries se trouvent maintenues au sein d'une matrice constituée dans une partie d'un réseau fibreux de nature amyloïde renforçant la cohésion au sein du biofilm⁷⁶.

II-2: Caractérisation structurale du motif d'interaction inter-porines

Par nos expériences nous avons démontré le rôle joué par les porines dans l'adhésion intercellulaire. Une question se pose désormais : ce mécanisme d'adhésion basé sur les porines est-il une propriété unique d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2, ou illustre t'il plutôt une fonction générale mais jusqu'ici inconnu des porines ?

Pour répondre à cette question, il convient de s'attarder sur le motif structural qui précède à l'interaction de nos porines avec elles mêmes. Dans les deux dimères de trimères, l'interaction entre monomères se faisant face dans chacun des deux trimères est un *steric zipper* similaire à ceux observés dans le cœur des fibres amyloïdes ou prioniques¹⁴⁰. Un *steric zipper* est une interface sèche, à laquelle ne participe aucune molécule d'eau et qui associe fermement deux segments peptidiques identiques par complémentarité stérique¹⁴¹. Les résidus impliqués dans la formation de ces *steric zippers* sont différents chez Omp-Pst1 et Omp-Pst2.

Chez Omp-Pst2, ce sont les segments 282-NLGNYG-287 de deux monomères se faisant face au sein du dimère de trimères qui s'associent (Figure 70 A, B). Ce segment peptidique

est présent dans la boucle L7 d'Omp-Pst2 et s'auto-associe sous la forme d'un *steric zipper* de classe I ¹⁴¹ (Figure 70 C). Cette interaction est renforcée par un réseau de liaison d'hydrogène associant les boucles L5 et L8 des monomères se faisant face.

Chez Omp-Pst1, ce sont les résidus 206-AGVVTSE-210 de la boucle L5 qui engagent la formation d'un *steric zipper* entre les monomères se faisant face dans le dimère de trimères (Figure 70 D, E). Le *steric zipper* résultant est de classe III ¹⁴¹, et renforcé par des interactions électrostatiques entre D331 et K334 présentes dans la boucle L8 des monomères se faisant face (Figure 70 F). On trouve dans la boucle L7 d'Omp-Pst1 une séquence similaire à celle observée chez Omp-Pst2, viz « 290-NLGNGY-295 ». Celle ci n'est cependant pas accessible à la formation du *steric zipper* du fait de la protrusion en coude β générée par la boucle L6 qui, chez Omp-Pst1, est plus longue de huit résidus par rapport à Omp-Pst2. Six de ces huit résidus supplémentaires contribuent le *steric zipper* qui associe les trimères d'Omp-Pst1 en dimère. Dans les deux dimères de trimères, on observe une large cavité centrale plutôt chargée négativement et d'un volume de 30610 Å³ chez Omp-Pst2 et de 37959 Å³ chez Omp-Pst1. Les surfaces d'interaction entre trimères sont en conséquence plus importantes chez Omp-Pst2 (1215 Å²) que chez Omp-Pst1 (615 Å²).

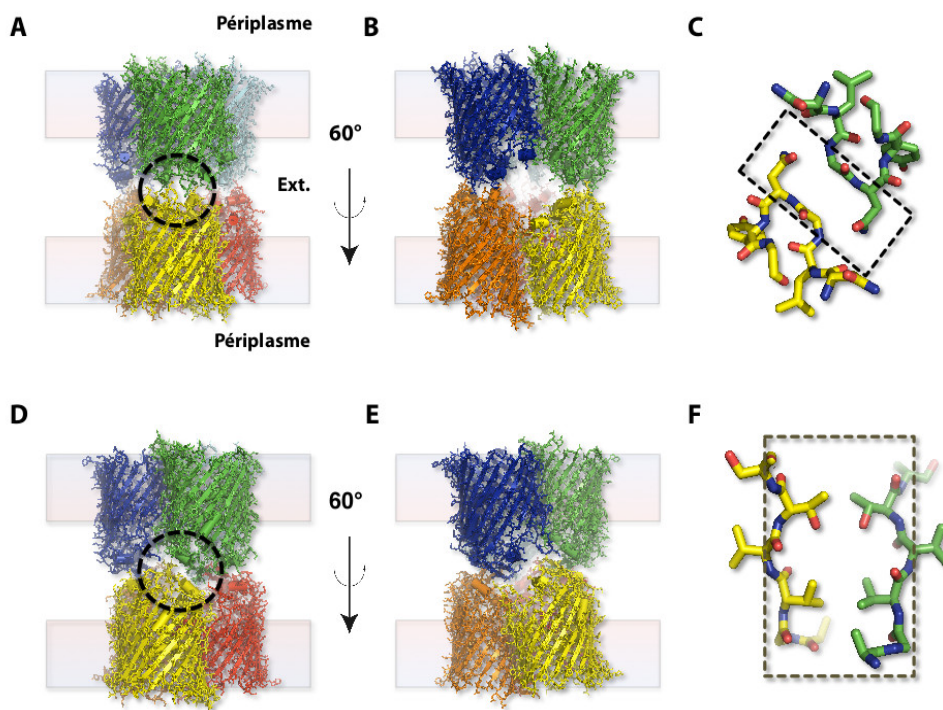


Figure 70: Les structures hexamériques d'Omp-Pst2 et Omp-Pst1 formées par l'association en face à face de deux trimères fonctionnels. La structure hexamérique d'Omp-Pst2 (A), résolue à 2.2 Å ; et d'Omp-Pst1 (D), résolue à 3.2 Å, vue à travers la membrane. La rotation de 60° des vues en A et D, montre l'existence des fenestrations ellipsoïdales localisées à proximité de l'interface d'interaction entre les deux trimères d'Omp-Pst2 (B) et d'Omp-Pst1 (E). Chaque monomère, au sein d'un hexamère est coloré distinctement pour faciliter l'interprétation. L'interface de dimérisation d'Omp-Pst2, correspondant

au fragment peptidique « 282-NLGNGY-287 » (C) et d'Omp-Pst1 correspondant au fragment peptidique « 206-AGVVT-210 » (F) sont représentée en isolation de la structure hexamérique entière. Le fragment « 282-NLGNGY-287 » d'Omp-Pst2 (C) s'auto-associe par une interaction de type « steric zipper » de classe I (face à face « face to face » *i.e.* orientation des faces, haut-haut « up-up » *i.e.* orientation des brins β ayant le même résidu aux extrémités des brins) selon la classification de Sawaya et al¹⁴¹. Le fragment « 206-AGVVT-210 » d'Omp-Pst1 (F) s'auto-associe par une interaction de type « steric zipper » de classe III (face à face « face to face » *i.e.* orientation des faces, haut-bas « up-down » *i.e.* orientation des brins β ayant le même résidu l'un en face de l'autre) selon la classification de Sawaya et al¹⁴¹.

L'observation d'un motif de type steric zipper comme étant à la base de la capacité des porines de *P. stuartii* à s'auto-associer suggère que ce type d'interaction pourrait être exploité par d'autres cellules à des fins d'adhésion cellulaire. Si ceci est vrai, des méthodes capables d'identifier le *steric zipper* au sein des structures amyloïdes devraient également être capables de les identifier dans les boucles externes des porines. La méthode dite de profil 3D score la propension de segments hexa-peptidiques à former des *steric zippers* en se basant sur le profil structural d'un *steric zipper* canonique¹⁴². Par une étude théorique et expérimentale conjointe, il a été démontré que des énergies plus basses que -19 kcal/mol identifiaient des segments à forte propensions de former des *steric zippers*, alors que des énergies plus basse que -23 kcal/mol correspondent à des segments formant invariablement des *steric zippers*¹⁴³. Les énergies associées à la formation d'un *steric zipper* pour 205-AGVVT-210 (Omp-Pst1) et 282-NLGNYG-287 (Omp-Pst2) sont de -24.4 et -22.1 kcal/mol, respectivement, confirmant que la méthode 3D profile peut identifier de tels segments dans les porines (Figure 71). Bien entendu, d'autres segments dans nos porines montrent une propension à s'engager dans ce type de structures. Ils sont cependant tous inaccessibles pour former un *steric zipper*, soit parce qu'ils font partie intégrante du tonneau β , soit parce qu'ils participent dans la formation d'hélices α .

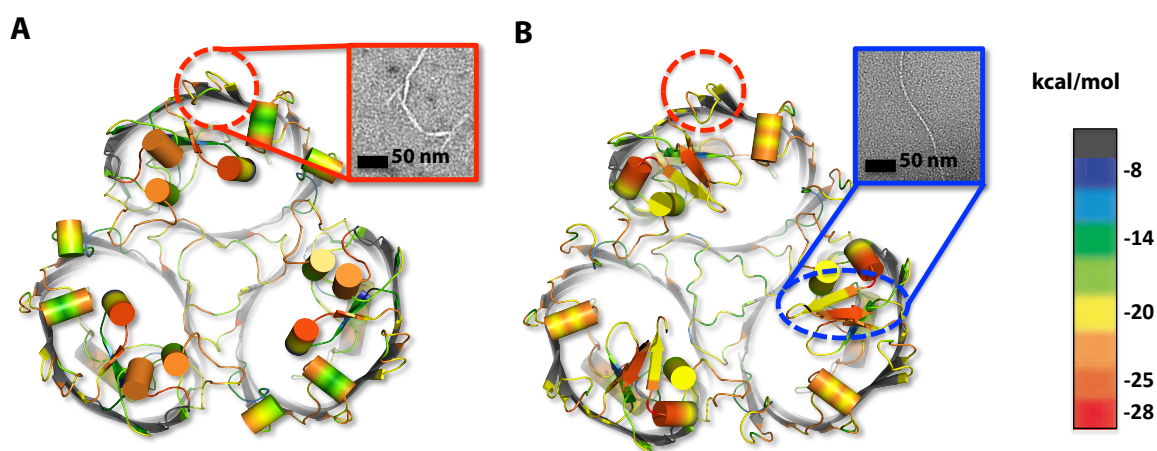


Figure 71: Les boucles externes des porines présentent une propension élevée à former des interactions de type « steric zipper ». A-B/ Diagramme en ruban, représentant la structure trimérique d'Omp-Pst2 (A) et Omp-Pst1 (B), vue du

côté extracellulaire. Le code couleur illustré ci-dessus dépend de la propension des segments peptidiques au sein des structures protéiques à former des fibres amyloïdes. La couleur rouge est ainsi associée à une propension élevée contrairement à la couleur bleue qui est associée à une propension faible. Le fragment peptidique « 282-NLGNYG-287 », correspondant à la boucle L7 d'Omp-Pst2 et Omp-Pst1, est localisé par des cercles pointillés en rouge. Le fragment peptidique « 205-AGVVTSE-210 », correspondant à la boucle L6 d'Omp-Pst1, est localisé par un ellipsoïde pointillé en bleu. Les micrographes de la microscopie électronique, indiqués dans des quadrants, confirment la présence des fibres en solutions de ces fragments peptidiques synthétisés chimiquement.

Afin de vérifier que les deux segments suscités adoptent bien une structure en *steric zipper* en isolation de leur protéine parent, nous les avons cristallisé et avons résolu leurs structures à 1.7 Å (Omp-Pst1 « 206-GVVTSE-211 ») et 0.8 Å (Omp-Pst2 « 282-NLGNYG-287 ») de résolution, respectivement (Figure 72). Les statistiques de collecte et d'affinement des deux structures peptidiques résolues sont représentées dans le tableau 6.

	206-GVVTSE-2011	283-LGNY-286
Ligne de lumière	ESRF ID23-2-EH2	ESRF ID23-2-EH2
Longueur d'onde du faisceau X (Å)	0.87	0.87
Résolution (Å)	45.45 - 1.91 (1.974 - 1.906)	23.51 - 0.896 (0.928 - 0.896)
Groupe d'espace	P 1	P 1
Paramètres de maille		
a, b, c (Å)	4.8 16.91 45.45	4.783 11.547 47.025
α, β, γ (°)	90.05 90.01 90.05	90 89.99 90
Nombre de réflexions uniques	1122 (126)	6301 (583)
Complétude (%)	97.82 (100.00)	83.20 (74.94)
Facteur de température B (wilson)	9.46	2.26
Quantité de solvant (%)	12.4	17.1
I/sigma(I)	3.12 (2.39)	8.82 (2.07)
Rfact	0.1474 (0.2113)	0.1045 (0.2542)
Rfree	0.2059 (0.2633)	0.1272 (0.2746)
Rmsd moyen des liaisons (Å)	0.019	0.013
Rmsd moyen des angles (°)	2.23	1.84
Contenu de l'unité asymétrique:		
Macromolécules	182	276
Ligands	164	132
Molécules d'eau	18	8
Résidus	24	16
Facteur de température moyen 	12.7	3.1
Ramachandran:		
Résidus dans la région favorable(%)	1.00E+02	1.00E+02
Résidus dans la région aberrante(%)	0	0

Les données entre parenthèse correspondent à la couche de plus haute résolution

Tableau 6: Résumé des paramètres cristallographiques et des statistiques d'affinement pour les deux structures peptidiques résolues.

Comme présumé, les deux structures sont des *steric zippers* typiques quoique différents de ceux observés dans le contexte des protéines parentes. Ainsi, le *steric zipper* de classe I observé pour 282-NLGNYG-287 dans Omp-Pst2 est un *steric zipper* de classe III en isolation du reste de la protéine. De même, le *steric zipper* de classe III observé pour 205-AGVVTSE-210 dans Omp-Pst1 est un *steric zipper* de classe I en isolation du reste de la protéine.

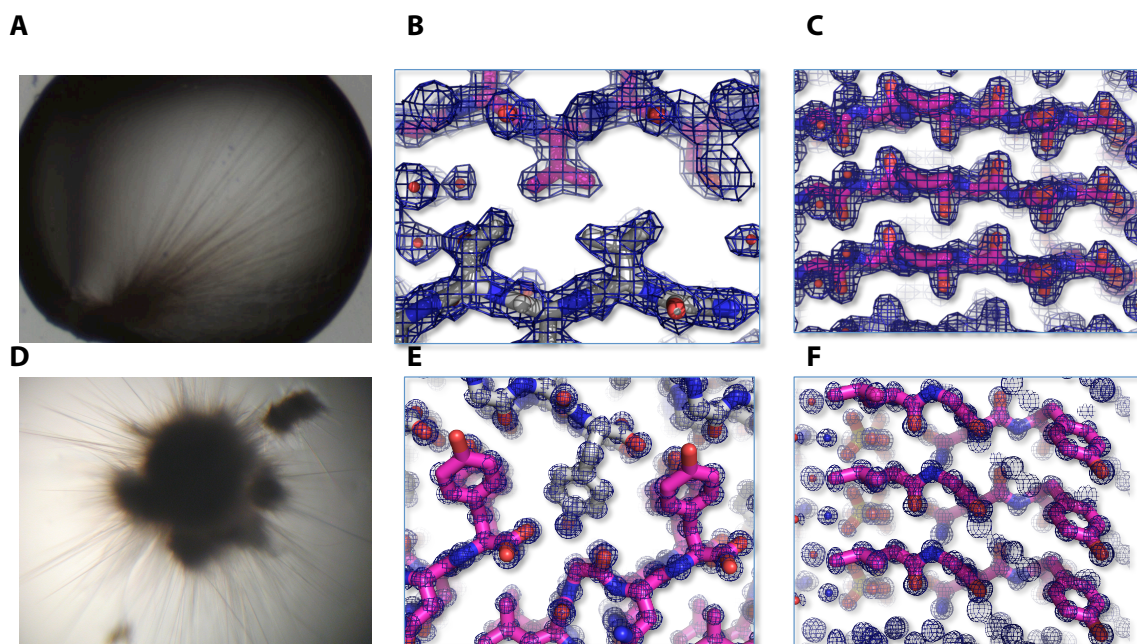


Figure 72: Caractérisation structurale des motifs de dimérisation d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. A/ Le peptide correspondant à la dimérisation d'Omp-Pst1 (206-GVVTSE-211) a pu être cristallisé sous la forme de micro-aiguilles brunes, en isolation de la structure entière. B-C/ La structure tridimensionnelle du fragment peptidique 206-GVVTSE-211 est résolue à 1,7 Å de résolution. La carte de densité électronique $2F_o - F_c$ à 1 sigma est également représentée en bleu. Cette structure montre l'interaction de type « steric zipper », vue perpendiculaire à l'axe de la fibre (B) ainsi que des répétitions de 4,8 Å, vues le long de l'axe de la fibre (C). D/ Le peptide correspondant à la zone d'interaction d'Omp-Pst2 (282-NLGNYG-287) est également cristallisé sous la forme de micro-aiguilles brunes. E-F/ Ce fragment peptidique est résolu à 0,9 Å de résolution. Il reproduit les mêmes caractéristiques d'une fibre amyloïde, d'une part l'interface d'interaction de type « steric zipper », vue perpendiculaire à l'axe de la fibre (E) ainsi que des répétitions de 4,8 Å, vues le long de l'axe de la fibre (F).

Une telle variation dans l'interface d'interaction n'est pas surprenante puisqu'il est connu que les *steric zippers* sont par nature polymorphes (ce qui est à la base du polymorphisme amyloïde)¹⁴⁴. Cela souligne cependant l'influence de la protéine dans son ensemble sur le motif d'interaction. A ce stade, il nous paraît important de noter que dans les structures de 205-AGVVTSE-210 (Omp-Pst1) et de 282-NLGNYG-287 (Omp-Pst2) isolés, les deux motifs forment des fibres amyloïdes en solution (Figure 73 A, B). Nous notons par ailleurs que nos observations sont les premières à mettre en évidence un *steric zipper* hors du contexte des protéines amyloïdes et prioniques, ce qui fournit la première rationalisation pour l'enrichissement des génomes bactériens (*E. coli*) et humains en de telles séquences. Enfin,

nous rappelons que les deux variantes cliniques d'Omp-Pst1 ont également cristallisé sous la forme de dimères de trimères, et présentent également des propriétés d'adhésion *in vitro*. Dans les structures des variantes cliniques d'Omp-Pst1 cependant, les deux trimères ne sont pas associées en face à face. Le défaut à former un *steric zipper* stable dans les cristaux est peut être influencé par la forte quantité de LPS qui reste attachés aux variantes cliniques d'Omp-Pst1 après purification. Si dans toutes nos expériences biochimiques nous diluons les porines, et minimisons ainsi l'effet des LPS qui leur sont attachés, il faut rappeler qu'à l'intérieur du cristal, nous les augmenterons.

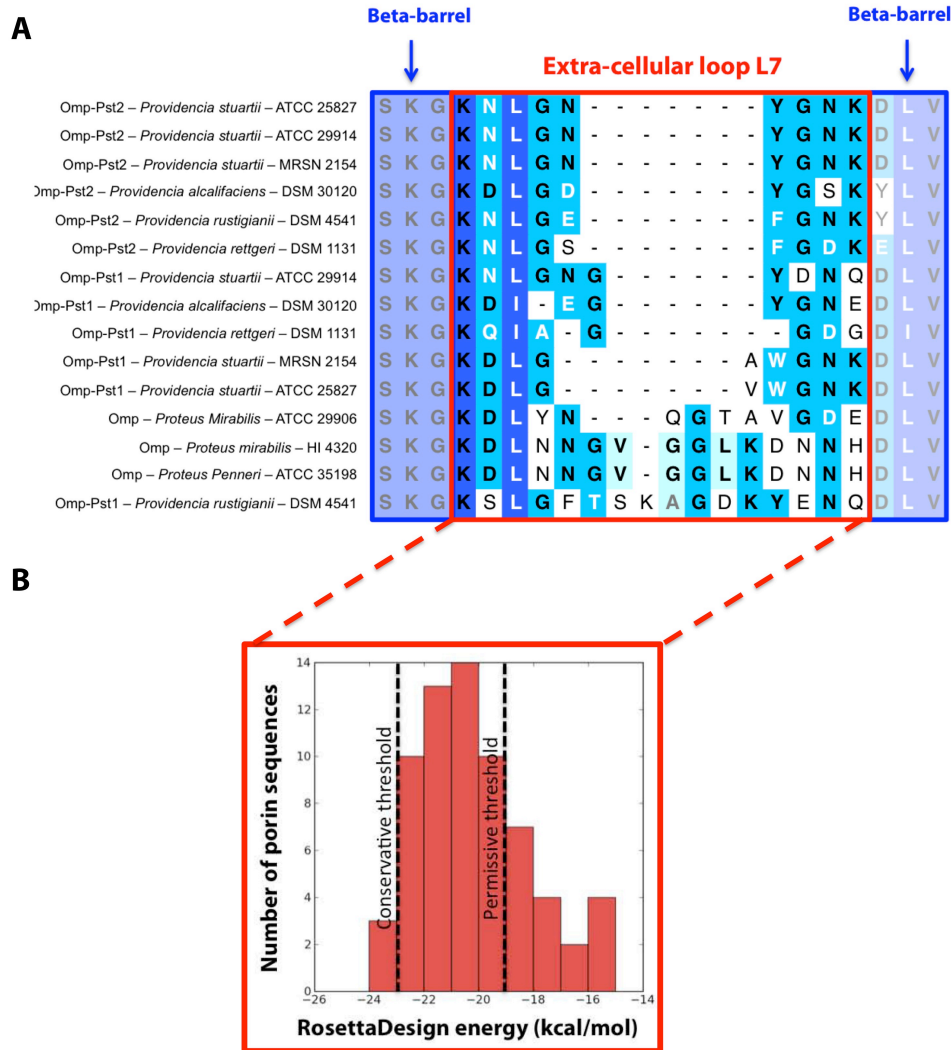


Figure 73: Conservation des séquences prônes à former des interactions de type *steric zipper* au sein des bactéries des genres *Providencia* et *Proteus*. A/ L'alignement multiple de séquence de la région de la boucle L7 des porines générales appartenant à différentes espèces bactériennes de *P. stuartii* et *Proteus*. B/ La propension de segments hexa-peptidiques à former des *steric zippers* a été vérifiée grâce à la méthode 3D profile. La plupart des segments possèdent des propensions élevées à former des *steric zippers*.

Les structures démontrent, en tous les cas, que la formation de *steric zipper* est la force motrice de l'auto-association de trimères d'Omp-Pst1 ou Omp-Pst2 en dimères de trimères. Elles suggèrent, par ailleurs, que les segments présentant une forte propension à former des *steric zippers*, et qui sont exposés dans une géométrie compatible avec la formation d'un brin β dans les boucles extracellulaires de porines, pourraient servir le but général de permettre à ces dernières de s'auto-associer, permettant ainsi aux cellules bactériennes d'établir un contact direct entre elles. Que la méthode 3D profile soit capable d'identifier de tels segments indique que les porines prônes à former des jonctions adhésives peuvent être identifiées sur la base de leur séquence. Il est intéressant de noter que toutes les porines homologues à Omp-

Pst1 ou Omp-Pst2 dans les genres *Providencia*, *Proteus* et *Yersinia* présentent dans leur boucle L7 une séquence homologue à celle trouvée dans la boucle L7 d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2. Le calcul des propensions de ces séquences à former des *steric zippers* indique qu'elles pourraient remplir un rôle semblable chez les espèces homologues chez *P. stuartii* (Figure 74).

Conclusion et perspectives

Les porines sont des actrices majeures dans la régulation de la perméabilité membranaire des bactéries à Gram-négatif. Elles permettent le contrôle du flux de nutriments et de métabolites hydrophiles indispensables à la survie et la croissance bactérienne. Elles sont également impliquées dans la résistance aux antibiotiques qu'elles peuvent faire émerger ou accentuer en réduisant ou en empêchant la diffusion de ces derniers au travers de leurs pores ^{3, 16, 145}. Une compréhension structurale de ce qui rend les porines plus ou moins perméables aux antibiotiques est nécessaire, afin de permettre le design rationnel de nouvelles drogues capables de contrecarrer ces systèmes. Bien que la structure moléculaire de cette famille de protéines soit connue et bien étudiée chez *E. coli*, de nombreuses questions restent à élucider. En particulier, il n'est pas connu comment les porines évoluent structuralement au cours ou suite à un traitement antibiotique.

Les porines, un rôle dans la résistance aux antibiotiques

Dans la première partie de cette étude, nous avons étudié les relations structure fonction au sein des deux porines générales de *Providencia stuartii*, Omp-Pst1 et Omp-Pst2. *P. stuartii* est un pathogène opportuniste impliqué dans des infections endémiques souvent mortelles chez les personnes âgées et les grands brûlés ¹⁴⁶. Il a été montré que c'est la porine Omp-Pst1 qui est majoritairement responsable de l'entrée des antibiotiques de type β -lactames au sein de *P. stuartii* ⁴⁴. Afin de comprendre comment évolue cette porine dans le contexte pathologique, notre étude a porté non seulement sur les variantes d'Omp-Pst1 exprimée par la souche sauvage, mais aussi sur deux variantes issues d'isolats cliniques. Ces isolats cliniques, NEA16 et 99645, ont été isolés chez des patients ayant contracté une infection nosocomiale à *P. stuartii* à l'hôpital de Nîmes et n'ayant pas guéri suite au traitement classique par l'imipénème, un carbapénème de dernière génération utilisé comme dernière ligne de traitement en milieu hospitalier. Ces isolats cliniques montrent une résistance accrue à une large gamme d'antibiotiques comparativement à la souche de référence ⁶².

Nous avons obtenu les structures des variantes sauvages d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 à 2.7 et 2.2 Å de résolution, respectivement. Dans le cas d'Omp-Pst2, la structure à plus haute résolution

est celle d'un hexamère, quand pour Omp-Pst1, la structure hexamérique n'a pu être déterminée qu'à 3.2 Å de résolution. Les structures des variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques ont quant à elles été résolues à 4.5 et 5.5 Å de résolution pour Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-Nea16, respectivement. La comparaison des différentes structures d'Omp-Pst1 semble pointer vers un consensus dans l'adaptation de cette porine *in situ*. Celui-ci repose sur l'accumulation de résidus chargés positivement dans les boucles extracellulaires et dans le canal, et résulte en une accentuation de son caractère anion sélectif. Nos résultats montrent par ailleurs que cette évolution induit une interaction plus forte avec les lipopolysaccharides (LPS), qui constituent la couche externe de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Cette observation a été permise par des expériences de spectrométrie de masse en phase gazeuse (données non montrées) et sur gel SDS Page. Nous postulons que c'est la présence de LPS qui a prévenu l'obtention des cristaux diffractant à une meilleure résolution étant considéré l'inhomogénéité intrinsèque de ces lipides et leur capacité à co-agréger plusieurs protéines. Des efforts d'optimisation du protocole de purification sont donc à poursuivre pour les deux variantes cliniques. Nous tenterons d'insérer une étiquette histidine sur nos porines afin de pouvoir les immobiliser sur une colonne d'affinité. Une délipidation avec différents types de détergent sera ensuite réalisée en présence de sel à une concentration élevée. Cette approche devrait permettre de diminuer les interactions hydrophiles et hydrophobes qui ont lieu entre porines et LPS. Il est tentant de proposer que l'interaction plus forte des variantes cliniques d'Omp-Pst1 avec les LPS a vocation à mieux camoufler la protéine dans la membrane, la rendant ainsi indétectable pour le système immunitaire.

Afin de déterminer si les différences structurales entre les différentes variantes d'Omp-Pst1 influent sur la translocation des antibiotiques, nous avons entrepris de mesurer la cinétique de translocation de plusieurs antibiotiques à travers ces porines, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de M Winterhalter à Brême. Nos mesures indiquent que pour la plupart des antibiotiques testés dont la charge globale est zwitterionique, la translocation au sein des variantes cliniques d'Omp-Pst1 est ralentie par rapport à ce qu'elle était pour la forme sauvage. Pour les antibiotiques chargés négativement, on observe au contraire une augmentation de la cinétique de translocation dans les variantes cliniques d'Omp-Pst1. On rappellera ici que l'imipénème, l'antibiotique qui a servi la sélection de ces isolats cliniques *in situ*, est un zwitterion au pH physiologique. Ces résultats sont en accord avec notre analyse structurale et démontrent le rôle critique joué par les porines dans la résistance aux antibiotiques. Nos résultats pointent donc vers une corrélation directe entre l'évolution des

porines dans les isolats cliniques et l'antibiothérapie utilisée.

Malgré la sensibilité élevée des mesures des caractérisations cinétiques permises par l'électrophysiologie à l'échelle du trimère de porines uniques, nous n'avons pas pu mesurer les K_{off} des variantes cliniques d'Omp-Pst1. Cette information reste requise pour avoir une image complète du processus de translocation des antibiotiques au travers les variantes d'Omp-Pst1 issues d'isolats cliniques. Il serait donc intéressant d'exploiter d'autres approches complémentaires à la BLM comme celles explicitées dans l'étude du mécanisme de translocation de l'imipénème et du méropénème à travers la variante sauvage d'Omp-Pst1 (Annexe 4). Une des méthodes exploitées au cours de cette étude pourrait être appliqué à nos systèmes, à savoir celle du gonflement des liposomes par diffusion ou *Liposome Swelling Assay*. Celle ci permettra de vérifier si oui ou non, les carbapénèmes pourront traverser le canal des variantes mutantes d'Omp-Pst1. Nous poursuivrons nos tentatives de résoudre la structure du complexe des variantes d'Omp-Pst1 sauvages et celles issues d'isolats cliniques en présence de différents antibiotiques de type β -lactames par cristallographie aux rayons X. Nous tenterons l'approche de trempage des cristaux de différentes variantes d'Omp-Pst1 selon l'approche décrite par Ziervogel et al ¹⁴⁷, à savoir limiter la présence des ions divalents (Mg^{2+}) dans la liqueur mère. Cette approche structurale qui offre une vision statique de la présence de l'antibiotique au sein du canal des porines pourra être complétée par d'autres approches offrant une vision dynamique du mécanisme de translocation des antibiotiques au sein du canal, notamment les simulations par la dynamique moléculaire.

Les porines, un rôle dans le mécanisme de voltage gating (manuscrit en préparation, annexe 5)

Les mesures de translocation à l'échelle de la molécule unique ont permis de mettre en évidence une très forte sensibilité au voltage chez Omp-Pst2. Dès ± 20 mV, la porine subit un gating, contre 150 à 200 mV pour la majorité des porines étudiées à ce jour. De plus, les mesures semblent indiquer que le gating est asymétrique. Il est raisonnable de proposer que la forte sensibilité au voltage d'Omp-Pst2 traduit des propriétés physiologiques uniques.

Afin d'élucider les déterminants moléculaires responsables de cette forte sensibilité au voltage d'Omp-Pst2, nous avons eu recours aux simulations par dynamique moléculaire. Les

simulations, réalisées en collaboration avec le laboratoire du Prof. Yechun Xu en Chine, montrent qu'un influx massif de cations du milieu extérieur vers le periplasme entraîne une fermeture du canal d'Omp-Pst2. La fermeture résulte du basculement de la boucle L3 dans le canal. Considérant sa sensibilité élevée au voltage, il est possible qu'Omp-Pst2 soit généralement présente sous sa forme fermée dans la membrane externe et que sa fonction soit d'empêcher la pénétration des cations à l'intérieur de la bactérie. Il faut noter que *P. stuartii* est souvent isolée dans des infections urinaires où la teneur en sels, notamment d'ammonium, est élevée. Afin de comprendre le rôle physiologique exact d'Omp-Pst2, il est impératif de trouver d'abord les conditions permettant son expression chez *P. stuartii*. Ceci pourrait être permis par la mise en culture de *P. stuartii* en urine synthétique sur plusieurs générations.

Les porines, un rôle dans l'adhésion intercellulaire

Les travaux menés pendant la deuxième partie de ma thèse ont permis de lever le voile sur une fonction non diffusive des porines dans la survie et le développement des bactéries. En effet, les structures hexamériques d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2 ont montré que ces protéines pouvaient s'associer en dimère de trimères, grâce à l'interaction par leurs boucles externe des monomères se faisant face dans chacun des trimères. C'est cette observation qui nous a poussé à émettre et vérifier l'hypothèse d'un rôle des porines dans la formation d'un biofilm bactérien. De même, elle nous a poussé à investiguer si oui ou non, les porines pourraient jouer un rôle dans la communication intercellulaire.

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la caractérisation fonctionnelle des porines en étudiant leurs propriétés adhésives *in vitro* par DLS, microscopie électronique, microscopie d'épifluorescence et microscopie à force atomique. Les résultats obtenus par DLS, montrent que les porines Omp-Pst1 et Omp-Pst2 possèdent la capacité de s'auto-associer en dimère avec une « auto »-affinité plus grande pour Omp-Pst2. Nous avons pu montrer que la capacité de ces porines à s'auto-associer est indépendante du pH. Des mesures similaires sur les variantes Omp-Pst1-99645 et Omp-Pst1-NEA16 montrent que cette propriété est conservée chez les variantes cliniques d'Omp-Pst1. Nous avons également étudié les propriétés d'adhésion de ces différentes porines après reconstitution dans des liposomes, *i.e.* dans un contexte membranaire, par DLS et par les différentes microscopies sus-mentionnées. Nos résultats sont consistants avec l'hypothèse d'une interaction face-à-face entre les porines reconstituées dans les liposomes. Pour compléter cette étude, nous avons étudié les propriétés

diffusives des dimères de trimères de porines par microscopie d'épifluorescence. Nous avons pu visualiser le transfert d'un fluorophore encapsulé dans des liposomes non marqués vers des autres liposomes marqués par la rhodamine mais ne contenant initialement pas de fluorophores dans leur lumen. Ainsi, les porines de *P. stuartii* pourraient jouer un rôle dans la communication interbactérienne, soit de façon directe, soit de façon indirecte.

Nous avons ensuite vérifié si les propriétés adhésives de nos porines étaient préservées dans le contexte cellulaire. Pour cela, nous avons eu recours à la microscopie d'épifluorescence et à la microscopie électronique, et avons travaillé sur deux modèles bactériens différents : i/ la souche *P. stuartii*, qui exprime majoritairement Omp-Pst1; ii/ des souches d'*E. coli* exprimant l'une ou l'autre des porines d'intérêt. Dans les deux cas, nous avons pu mettre en évidence la formation de biofilms gigantesques. Notre observation est cependant que malgré la proximité des bactéries au sein de ces édifices biologiques, les contacts directs entre membranes externes sont rares. Il est cependant évident que dans le cas des biofilms intersticiels (2D), les bactéries poussent sur une surface nutritionnelle et restent en contact les unes aux autres au cours du mécanisme de l'expansion. La présence d'une matrice polysaccharidique dans le biofilm en 3D pourrait être un facteur défavorisant les contacts directs entre les bactéries. Nous tenterons de réaliser des coupes ultrafines suivies d'immunomarquage des porines sur les biofilms intersticiels afin de localiser d'une façon spécifique l'implication des porines dans l'adhésion intercellulaire.

Une caractéristique inattendue des dimères de trimères d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2, est que dans les deux cas, c'est un motif de type *steric zipper* qui associe deux-à-deux les monomères issus de chacun des trimères. A notre connaissance, c'est la première fois que ces motifs sont observés, hors du contexte des protéines de type amyloïde ou prions¹⁴¹. Notre hypothèse est que l'auto-association de ces séquences est à l'origine des propriétés auto-adhésives des porines de *P. stuartii*. Des études fonctionnelles de mutagenèse dirigée sont donc à prévoir afin de vérifier la spécificité de ces séquences. L'approche décrite par DLS au cours de cette étude pourra être également être exploitée sur des porines d'Omp-Pst1 ou Omp-Pst2, mutées de leurs motifs de dimerisation identifiés. Elle pourra enfin être étendue aux autres porines des genres *Providencia*, *Yersinia* et *Proteus*, qui toutes présentent un motif similaire au « 282-NLGNYG-287 » d'Omp-Pst2 dans leur boucle L7.

Puisque notre étude suggère un rôle des porines dans l'association intercellulaire *in vivo* et

particulièrement au sein des biofilms intersticiels une perspective majeure de ce travail serait donc de tester l'inhibition de la formation de ces biofilms bactériens, en présence ou en absence des porines purifiées. Le mode d'action présumé de ces macromolécules serait de s'associer à leurs cibles homologues au sein des membranes externes des bactéries par le même type interaction exploité par les porines lors de l'adhésion intercellulaire, à savoir le *steric zipper*. Si l'ajout de ces macromolécules induit la perturbation du développement du biofilms bactériens, les porines pourront être considérées comme des cibles prometteuses dans la thérapie « anti-bofilm ».

Références

Références

1. Alekshun, M.N. & Levy, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**, 1037-1050 (2007).
2. Kumar, A. & Schweizer, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews* **57**, 1486-1513 (2005).
3. Pages, J.M., James, C.E. & Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 893-903 (2008).
4. Nakae, T. Outer membrane of Salmonella. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *The Journal of biological chemistry* **251**, 2176-2178 (1976).
5. Luderitz, O. *et al.* Lipopolysaccharides: structural principles and biologic activities. *Reviews of infectious diseases* **6**, 428-431 (1984).
6. Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. & Poxton, I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4**, 837-851 (2002).
7. Nikaido, H. & Vaara, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews* **49**, 1-32 (1985).
8. Vaara, M. Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in gram-negative enteric bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**, 354-356 (1993).
9. Koebnik, R., Locher, K.P. & Van Gelder, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology* **37**, 239-253 (2000).
10. Pages, J.M. [Bacterial porin and antibiotic susceptibility]. *Medecine sciences : M/S* **20**, 346-351 (2004).
11. Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K. & Welte, W. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**, 2215-2220 (1998).
12. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **67**, 593-656 (2003).
13. Walsh, C. Where will new antibiotics come from? *Nature reviews. Microbiology* **1**, 65-70 (2003).
14. Levy, S.B. & Nelson, M. Reversing tetracycline resistance. A renaissance for the tetracycline family of antibiotics. *Advances in experimental medicine and biology* **456**, 17-25 (1998).
15. Neu, H.C. Quinolone Antimicrobial Agents. *Annu Rev Med* **43**, 465-486 (1992).
16. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* **78**, 119-146 (2009).
17. Arias, C.A. & Murray, B.E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge. *The New England journal of medicine* **360**, 439-443 (2009).
18. Alibert-Franco, S., Pradines, B., Mahamoud, A., Davin-Regli, A. & Pages, J.M. Efflux mechanism, an attractive target to combat multidrug resistant Plasmodium falciparum and Pseudomonas aeruginosa. *Current medicinal chemistry* **16**, 301-317 (2009).
19. Courvalin, P. New plasmid-mediated resistances to antimicrobial agents. *Archives of microbiology* **189**, 289-291 (2008).
20. Andremont, A., Gerbaud, G. & Courvalin, P. Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **29**, 515-518 (1986).
21. Courvalin, P. & Carrier, C. Transposable multiple antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae. *Molecular & general genetics : MGG* **205**, 291-297

- (1986).
22. Wright, G.D. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Current opinion in microbiology* **2**, 499-503 (1999).
23. Hooper, D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging infectious diseases* **7**, 337-341 (2001).
24. Nikaido, H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* **178**, 5853-5859 (1996).
25. Li, X.Z. & Nikaido, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**, 159-204 (2004).
26. Charbit, A. *et al.* In vivo and in vitro studies of transmembrane beta-strand deletion, insertion or substitution mutants of the Escherichia coli K-12 maltoporin. *Molecular microbiology* **35**, 777-790 (2000).
27. Karshikoff, A., Spassov, V., Cowan, S.W., Ladenstein, R. & Schirmer, T. Electrostatic properties of two porin channels from Escherichia coli. *Journal of molecular biology* **240**, 372-384 (1994).
28. Hasegawa, Y., Yamada, H. & Mizushima, S. Interactions of outer membrane proteins O-8 and O-9 with peptidoglycan sacculus of Escherichia coli K-12. *Journal of biochemistry* **80**, 1401-1409 (1976).
29. Nikaido, H. & Rosenberg, E.Y. Porin channels in Escherichia coli: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *Journal of bacteriology* **153**, 241-252 (1983).
30. Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E. & Silhavy, T.J. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **20**, 911-917 (1996).
31. Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J. & Silhavy, T.J. The Cpx two-component signal transduction pathway of Escherichia coli regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes & development* **9**, 387-398 (1995).
32. Matsubara, M., Kitaoka, S.I., Takeda, S.I. & Mizuno, T. Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by his-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in Escherichia coli. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **5**, 555-569 (2000).
33. Death, A., Notley, L. & Ferenci, T. Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into Escherichia coli under conditions of nutrient stress. *Journal of bacteriology* **175**, 1475-1483 (1993).
34. Taurig, M. & Misra, R. Identification of bacteriophage K20 binding regions of OmpF and lipopolysaccharide in Escherichia coli K-12. *FEMS microbiology letters* **181**, 101-108 (1999).
35. Fourel, D., Mizushima, S., Bernadac, A. & Pages, J.M. Specific regions of Escherichia coli OmpF protein involved in antigenic and colicin receptor sites and in stable trimerization. *Journal of bacteriology* **175**, 2754-2757 (1993).
36. Zhang, E. & Ferenci, T. OmpF changes and the complexity of Escherichia coli adaptation to prolonged lactose limitation. *FEMS microbiology letters* **176**, 395-401 (1999).
37. Housden, N.G. *et al.* Directed epitope delivery across the Escherichia coli outer membrane through the porin OmpF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21412-21417 (2010).
38. Charrel, R.N., Pages, J.M., De Micco, P. & Mallea, M. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant Enterobacter aerogenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**, 2854-2858 (1996).

39. Bornet, C., Davin-Regli, A., Bosi, C., Pages, J.M. & Bollet, C. Imipenem resistance of enterobacter aerogenes mediated by outer membrane permeability. *Journal of clinical microbiology* **38**, 1048-1052 (2000).
40. Simonet, V., Mallea, M. & Pages, J.M. Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the Escherichia coli OmpF channel. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 311-315 (2000).
41. Thiolas, A., Bornet, C., Davin-Regli, A., Pages, J.M. & Bollet, C. Resistance to imipenem, cefepime, and ceftazidime associated with mutation in Omp36 osmoporin of Enterobacter aerogenes. *Biochemical and biophysical research communications* **317**, 851-856 (2004).
42. Tran, Q.T. *et al.* Implication of porins in beta-lactam resistance of Providencia stuartii. *The Journal of biological chemistry* **285**, 32273-32281 (2010).
43. Mirzabekov, T., Ballarin, C., Nicolini, M., Zatta, P. & Sorgato, M.C. Reconstitution of the native mitochondrial outer membrane in planar bilayers. Comparison with the outer membrane in a patch pipette and effect of aluminum compounds. *The Journal of membrane biology* **133**, 129-143 (1993).
44. Bajaj, H. *et al.* Antibiotic uptake through membrane channels: role of Providencia stuartii OmpPst1 porin in carbapenem resistance. *Biochemistry* **51**, 10244-10249 (2012).
45. Im, W. & Roux, B. Ion permeation and selectivity of OmpF porin: a theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *Journal of molecular biology* **322**, 851-869 (2002).
46. Danelon, C., Suenaga, A., Winterhalter, M. & Yamato, I. Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation. *Biophysical chemistry* **104**, 591-603 (2003).
47. O'Hara, C.M., Brenner, F.W. & Miller, J.M. Classification, identification, and clinical significance of Proteus, Providencia, and Morganella. *Clinical microbiology reviews* **13**, 534-546 (2000).
48. Overturf, G.D., Wilkins, J. & Ressler, R. Emergence of resistance of Providencia stuartii to multiple antibiotics: speciation and biochemical characterization of Providencia. *The Journal of infectious diseases* **129**, 353-357 (1974).
49. Tumbarello, M. *et al.* ESBL-producing multidrug-resistant Providencia stuartii infections in a university hospital. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **53**, 277-282 (2004).
50. de Champs, C. *et al.* New TEM variant (TEM-92) produced by Proteus mirabilis and Providencia stuartii isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 1278-1280 (2001).
51. Franceschini, N. *et al.* Ceftazidime and aztreonam resistance in Providencia stuartii: characterization of a natural TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase, TEM-60. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**, 1459-1462 (1998).
52. Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., Flevari, K., Tsakiri, M. & Douzinas, E.E. Providencia stuartii with VIM-1 metallo-beta-lactamase. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **60**, 183-184 (2007).
53. Shiroto, K. *et al.* Metallo-beta-lactamase IMP-1 in Providencia rettgeri from two different hospitals in Japan. *Journal of medical microbiology* **54**, 1065-1070 (2005).
54. Hammond, M.L. Ertapenem: a Group 1 carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **53** Suppl 2, ii7-9 (2004).
55. Plante, I., Centron, D. & Roy, P.H. An integron cassette encoding erythromycin esterase, ere(A), from Providencia stuartii. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*

- 51, 787-790 (2003).
56. Mitsuyama, J., Hiruma, R., Yamaguchi, A. & Sawai, T. Identification of porins in outer membrane of *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* spp. and their role in outer membrane permeation of beta-lactams. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 379-384 (1987).
57. Delcour, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta* **1794**, 808-816 (2009).
58. Lee, E.H. *et al.* Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **35**, 1093-1098 (1991).
59. Bradford, P.A. *et al.* Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 563-569 (1997).
60. Tran Q-T, W.H., Winterhalter M, Pages J-M, & Davin-Regli A Clinical *Providencia stuartii* isolates are characterized by an enzymatic beta-lactam resistance and an epidemiological variability of OmpPst1 porin loops in response to antibiotic use (in preparation).
61. Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology* **11**, 1034-1043 (2009).
62. Broomfield, R.J., Morgan, S.D., Khan, A. & Stickler, D.J. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *Journal of medical microbiology* **58**, 1367-1375 (2009).
63. Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. & Lejeune, P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **181**, 5993-6002 (1999).
64. Costerton, J.W. Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents* **11**, 217-221; discussion 237-219 (1999).
65. Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M. & Harshey, R.M. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology* **182**, 6308-6321 (2000).
66. Periasamy, S. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1281-1286 (2012).
67. Bassler, C.M.W.a.B.L. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319-346 (2005).
68. Dandekar, A.A., Chugani, S. & Greenberg, E.P. Bacterial quorum sensing and metabolic incentives to cooperate. *Science* **338**, 264-266 (2012).
69. Davies, D.G. *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298 (1998).
70. Flemming, H.C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 623-633 (2010).
71. Romero, D., Aguilar, C., Losick, R. & Kolter, R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2230-2234 (2010).
72. Stewart, P.S. & Franklin, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 199-210 (2008).
73. Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. & Davies, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology* **184**, 1140-1154 (2002).

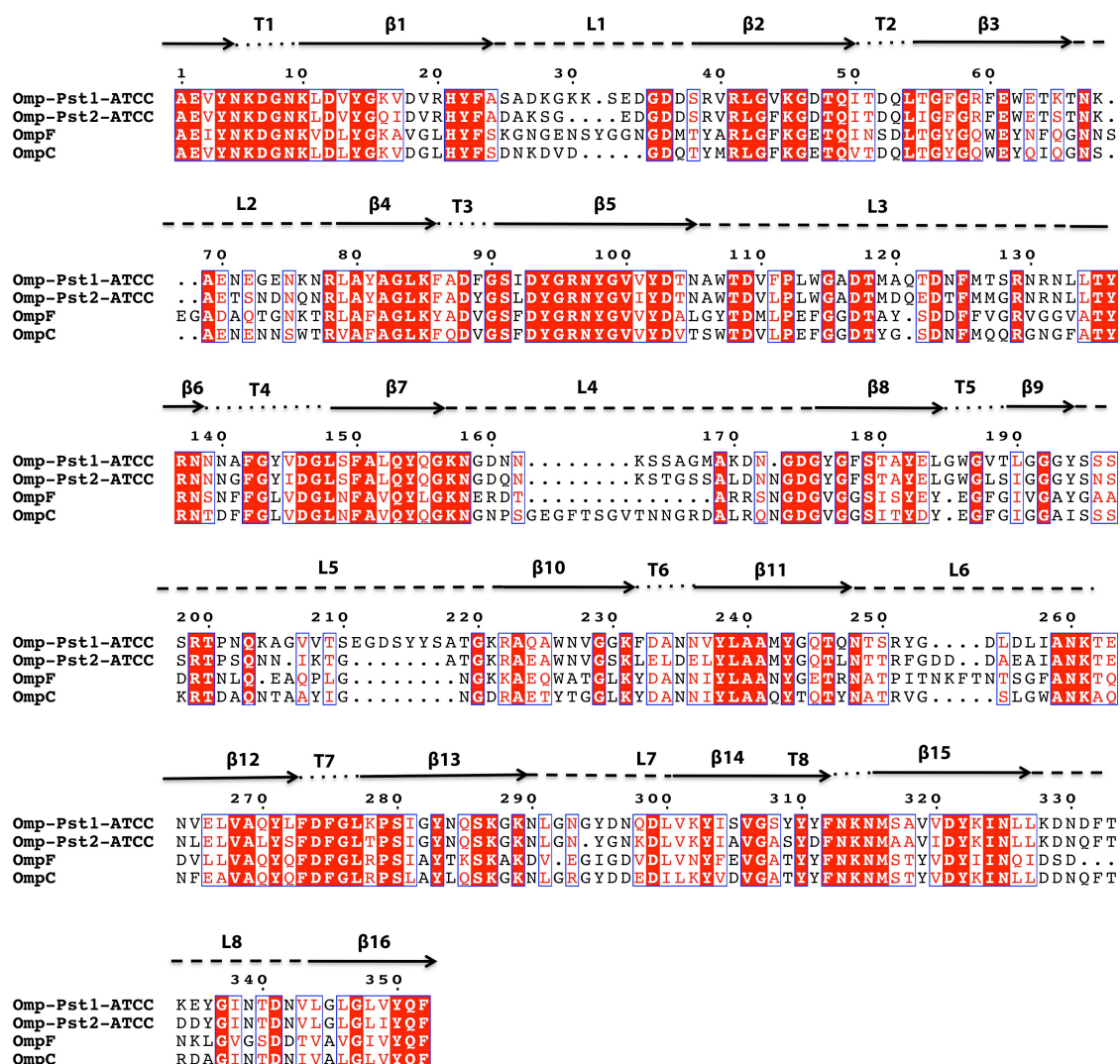
74. Schwartz, K., Syed, A.K., Stephenson, R.E., Rickard, A.H. & Boles, B.R. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS pathogens* **8**, e1002744 (2012).
75. Xavier, J.B. Social interaction in synthetic and natural microbial communities. *Molecular systems biology* **7**, 483 (2011).
76. Lawrence, D. *et al.* Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. *PLoS biology* **10**, e1001330 (2012).
77. Marrie, T.J., Nelligan, J. & Costerton, J.W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* **66**, 1339-1341 (1982).
78. Stickler, D.J. & Morgan, S.D. Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. *Journal of medical microbiology* **55**, 489-494 (2006).
79. Hoiby, N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC medicine* **9**, 32 (2011).
80. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 48-56 (2007).
81. Anderl, J.N., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 1818-1824 (2000).
82. Lewis, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 999-1007 (2001).
83. Korea, C.G., Ghigo, J.M. & Beloin, C. The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **33**, 300-311 (2011).
84. Rodrigues, L.R. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. *Advances in experimental medicine and biology* **715**, 351-367 (2011).
85. Saiman, L. *et al.* Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **290**, 1749-1756 (2003).
86. Fey, P.D. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? *Current opinion in microbiology* **13**, 610-615 (2010).
87. Kolodkin-Gal, I. *et al.* A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell* **149**, 684-692 (2012).
88. Kolodkin-Gal, I. *et al.* D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**, 627-629 (2010).
89. Allison, K.R., Brynildsen, M.P. & Collins, J.J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* **473**, 216-220 (2011).
90. Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology* **13**, 238-252 (1965).
91. D.S. Dimitrov, M.I.A. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **253**, 323-336 (1988).
92. Rigaud, J.L., Pitard, B. & Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1231**, 223-246 (1995).
93. Bechinger, B. & Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic

- antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1529-1539 (2006).
94. Winterhalter, M. & Lasic, D.D. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chemistry and physics of lipids* **64**, 35-43 (1993).
 95. Colletier, J.P., Chaize, B., Winterhalter, M. & Fournier, D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC biotechnology* **2**, 9 (2002).
 96. Tsai, F.C., Stuhmann, B. & Koenderink, G.H. Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **27**, 10061-10071 (2011).
 97. McPherson, A., Jr. Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *The Journal of biological chemistry* **251**, 6300-6303 (1976).
 98. Berger, B.W., Gendron, C.M., Robinson, C.R., Kaler, E.W. & Lenhoff, A.M. The role of protein and surfactant interactions in membrane-protein crystallization. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **61**, 724-730 (2005).
 99. Faham, S. & Bowie, J.U. Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *Journal of molecular biology* **316**, 1-6 (2002).
 100. Landau, E.M. & Rosenbusch, J.P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14532-14535 (1996).
 101. McCoy, A.J. et al. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
 102. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography* **64**, 112-122 (2008).
 103. Schneider, T.R. & Sheldrick, G.M. Substructure solution with SHELXD. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **58**, 1772-1779 (2002).
 104. Sheldrick, G.M. & Schneider, T.R. SHELXL: high-resolution refinement. *Methods in enzymology* **277**, 319-343 (1997).
 105. Weeks, C.M., R SnB: Applying Shake-and-Bake to Proteins. *Mol. Biophys.* (1993).
 106. Adams, P.D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 213-221 (2010).
 107. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **53**, 240-255 (1997).
 108. Prilipov, A., Phale, P.S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J.P. & Koebnik, R. Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from E. coli. *FEMS microbiology letters* **163**, 65-72 (1998).
 109. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 795--800 (1993).
 110. Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins* **23**, 318-326 (1995).
 111. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**, 2126-2132 (2004).
 112. Murshudov, G.N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**, 355-367 (2011).
 113. Brooks, T. & Keevil, C.W. A simple artificial urine for the growth of urinary

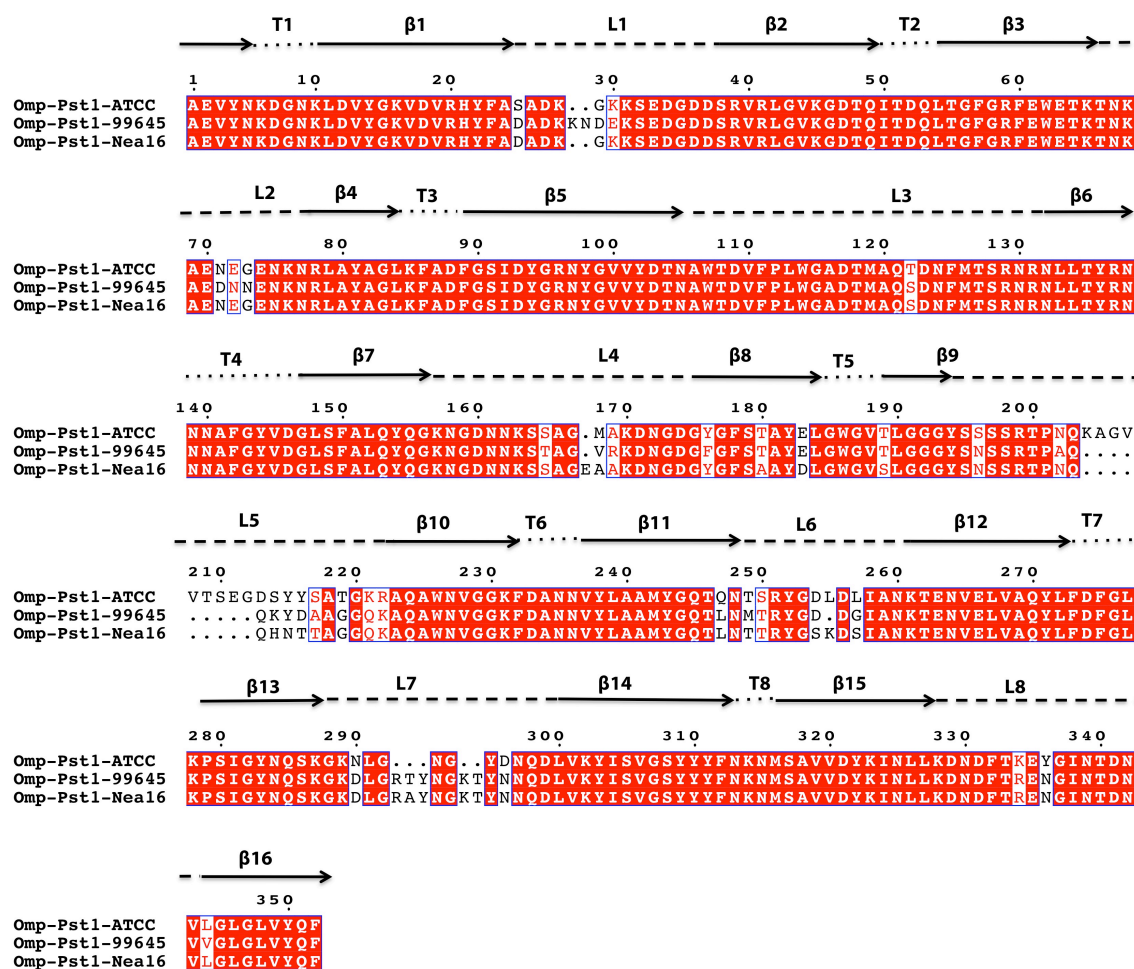
- pathogens. *Letters in applied microbiology* **24**, 203-206 (1997).
114. Garavito, R.M. & Rosenbusch, J.P. Isolation and crystallization of bacterial porin. *Methods in enzymology* **125**, 309-328 (1986).
115. le Maire, M., Champeil, P. & Moller, J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et biophysica acta* **1508**, 86-111 (2000).
116. Alcorn, T. & Juers, D.H. Progress in rational methods of cryoprotection in macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 366-373 (2010).
117. Nakae, T. & Nikaido, H. Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium*. Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer. *The Journal of biological chemistry* **250**, 7359-7365 (1975).
118. Simonet, V., Mallea, M., Fourel, D., Bolla, J.M. & Pages, J.M. Crucial domains are conserved in Enterobacteriaceae porins. *FEMS microbiology letters* **136**, 91-97 (1996).
119. Robinson, J.A. beta-Hairpin Peptidomimetics: Design, Structures and Biological Activities. *Accounts Chem Res* **41**, 1278-1288 (2008).
120. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10037-10041 (2001).
121. Smart, O.S., Neduvilil, J.G., Wang, X., Wallace, B.A. & Sansom, M.S. HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *Journal of molecular graphics* **14**, 354-360, 376 (1996).
122. Berkane, E. *et al.* Nanopores: maltoporin channel as a sensor for maltodextrin and lambda-phage. *Journal of nanobiotechnology* **3**, 3 (2005).
123. Arbing, M.A. *et al.* Charged residues in surface-located loops influence voltage gating of porin from *Haemophilus influenzae* type b. *The Journal of membrane biology* **178**, 185-193 (2000).
124. Bainbridge, G., Mobasher, H., Armstrong, G.A., Lea, E.J. & Lakey, J.H. Voltage-gating of *Escherichia coli* porin: a cysteine-scanning mutagenesis study of loop 3. *Journal of molecular biology* **275**, 171-176 (1998).
125. Benz, R., Janko, K., Boos, W. & Lauger, P. Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **511**, 305-319 (1978).
126. Brunen, M. & Engelhardt, H. Asymmetry of orientation and voltage gating of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34 in lipid bilayers. *European journal of biochemistry / FEBS* **212**, 129-135 (1993).
127. Jeanteur, D. *et al.* Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10675-10679 (1994).
128. Simonet, V.C., Basle, A., Klose, K.E. & Delcour, A.H. The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmpT have distinct channel properties. *The Journal of biological chemistry* **278**, 17539-17545 (2003).
129. Maeda, S. *et al.* Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597-602 (2009).
130. Gloag, E.S. *et al.* Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 11541-11546 (2013).
131. Mattick, J.S. Type IV pili and twitching motility. *Annual review of microbiology* **56**,

- 289-314 (2002).
132. Ng, W.L. & Bassler, B.L. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics* **43**, 197-222 (2009).
133. Wiltzius, J.J. *et al.* Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nature structural & molecular biology* **16**, 973-978 (2009).
134. Sawaya, M.R. *et al.* Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453-457 (2007).
135. Thompson, M.J. *et al.* The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4074-4078 (2006).
136. Liu, Y. & Kuhlman, B. RosettaDesign server for protein design. *Nucleic acids research* **34**, W235-238 (2006).
137. Colletier, J.P. *et al.* Molecular basis for amyloid-beta polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16938-16943 (2011).
138. Davin-Regli, A. *et al.* Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Current drug targets* **9**, 750-759 (2008).
139. R, M.J.B. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Prokaryotes* 245-269 (2006).
140. Ziervogel, B.K. & Roux, B. The binding of antibiotics in OmpF porin. *Structure* **21**, 76-87 (2013).

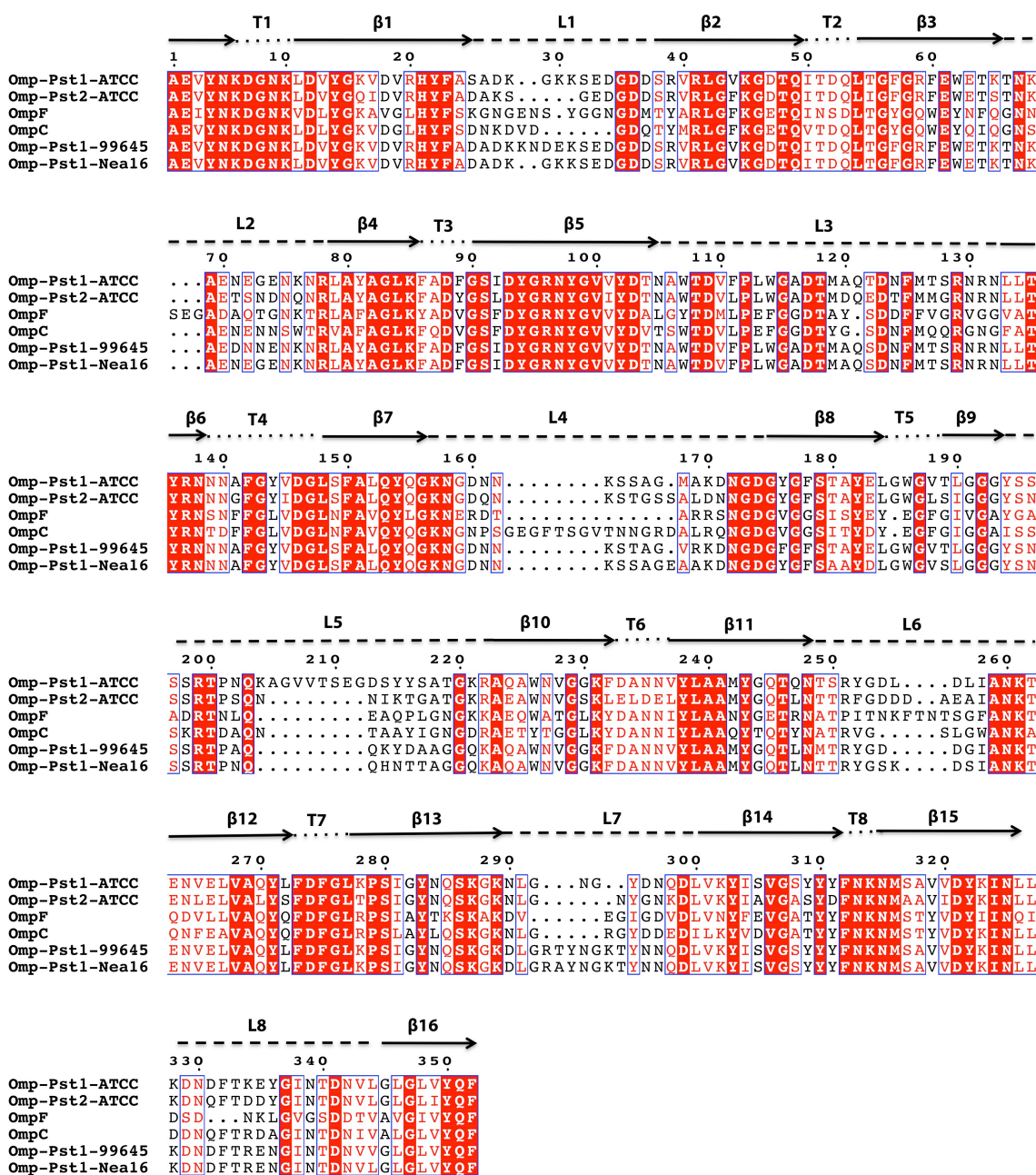
Annexes



Annexe 1: L'alignement multiple des séquences des porines non spécifiques de *P. stuartii* et d'*E. coli*. Cet alignement a été réalisé avec les deux logiciels en ligne, CUSTWAL oméga et ESPRIPT 2.2. Les régions des boucles externes (L1-L8), coudes internes (T1-T8) ainsi que les feuillets β (β1-β16) ont été également indiqués.



Annexe 2: L'alignement multiple des séquences des variantes d'Omp-Pst1. Cet alignement a été réalisé avec les deux logiciels en ligne, CUSTWAL oméga et ESPRIPT 2.2. Les régions des boucles externes (L1-L8), coudes internes (T1-T8) ainsi que les feuillets β (β1-β16) ont été également indiqués.



Annexe 3: L'alignement multiple des séquences des porines non spécifiques de *P. stuartii* et d'*E. coli*. Cet alignement a été réalisé avec les deux logiciels en ligne, CUSTWAL oméga et ESPRIPT 2.2. Les régions des boucles externes (L1-L8), coudes internes (T1-T8) ainsi que les feuillets β (β1-β16) ont été également indiqués.

Antibiotic Uptake through Membrane Channels: Role of *Providencia stuartii* OmpPst1 Porin in Carbapenem Resistance

Harsha Bajaj,[†] Que-Tien Tran,^{†,‡} Kozhinjampara R. Mahendran,[†] Chady Nasrallah,[§] Jacques-Philippe Colletier,[§] Anne Davin-Regli,[‡] Jean-Michel Bolla,[‡] Jean-Marie Pagès,[‡] and Mathias Winterhalter^{*,†}

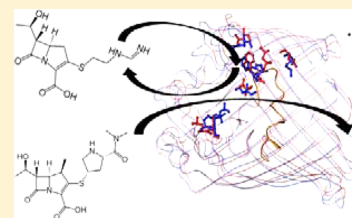
[†]School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen, Bremen, Germany

[‡]UMR-MD1, Aix-Marseille Université, IRBA, Marseille, France

[§]Institut de Biologie Structurale UMR5075, CEA-CNRS-UJF, Grenoble, France

S Supporting Information

ABSTRACT: The role of major porin OmpPst1 of *Providencia stuartii* in antibiotic susceptibility for two carbapenems is investigated by combining high-resolution conductance measurements, liposome swelling, and microbiological assays. Reconstitution of a single OmpPst1 into a planar lipid bilayer and measuring the ion current, in the presence of imipenem, revealed a concentration-dependent decrease in conductance, whereas meropenem produced well-resolved short ion current blockages. Liposome swelling assays suggested a small flux of imipenem in contrast to a rapid permeation of meropenem. The lower antibiotic susceptibility of *P. stuartii* to imipenem compared to meropenem correlated well with the decreased level of permeation of the former through the OmpPst1 channel.



Gram-negative bacteria have a complex cell envelope comprising an outer membrane and an inner membrane that delimit the periplasm. The outer membrane contains various protein channels, called porins, involved in the influx of hydrophilic compounds, including several classes of antibiotics.^{1–3} A major requirement for effective antibacterial activity is the rapid delivery to the target site. The occurrence of bacterial resistance requires that we understand the molecular mechanisms. Altered porin permeability might be the limiting factor for intracellular target achievement of hydrophilic antibiotics such as β -lactams.^{4–8}

For example, *Providencia stuartii*, belonging to the Proteae in the Enterobacteriaceae family, is one of the most pathogenic bacteria in clinics.^{9,10} It causes hospital-acquired infections and is usually found in urinary tract of patients undergoing long-term indwelling catheterization. *P. stuartii* strains show high levels of resistance to a majority of antibiotic classes but were found to remain susceptible to most of the carbapenems.¹¹ However, carbapenem resistance has occurred in clinical isolates and is frequently related to the alteration of porins, although sometimes in association with an enzymatic mechanism, e.g., carbapenemase.^{12–15} Our previous study revealed two major porins in *P. stuartii*: OmpPst1 and OmpPst2. OmpPst1 is known to be involved in the passive diffusion of β -lactams.¹⁶ Ertapenem, a carbapenem molecule, revealed strong antibiotic–channel interaction compared to that of cephalosporins.¹⁶ In the following, we focus on the permeation of two clinically relevant and chemically divergent antibiotics, imipenem and meropenem, through OmpPst1 (Figures 1A and 2A). An appropriate method is their

reconstitution into a planar lipid bilayer with subsequent recording of the ion current. As previously shown, the penetration of antibiotic molecules into the channel and subsequent interaction of the drug with the channel may interrupt the ion current.¹⁷ The analysis of ion current fluctuation allows us to obtain permeation rates as previously shown for sugars and ampicillin.^{17,18} However, there are limitations of this technique. In particular, because of finite time resolution, the signal of very fast permeation is indistinguishable from no permeation. Thus, a combination of techniques is needed to reach a conclusion about antibiotic translocation.

Here, we first determined the antibiotic susceptibility of *P. stuartii* for two clinically used antibiotics, imipenem and meropenem, by measuring their MIC values.¹⁶ We then reconstituted a single OmpPst1 into an artificial planar lipid bilayer and characterized time-resolved ion current fluctuations in the presence of antibiotics. Single-channel analysis of ion currents through a porin in the presence of antibiotics revealed effective binding constants and subsequently the transport parameters at a single-molecule level. To further confirm translocation events, we performed liposome swelling assays,^{19,20} which allowed estimation of the flux of the two antibiotics through OmpPst1 channels.

Received: October 13, 2012

Revised: November 30, 2012

Published: December 4, 2012

MATERIALS AND METHODS

All chemicals used were purchased from Applichem (Darmstadt, Germany), except *n*-octyl polyoxyethylene (octyl-POE) (Alexis, L  uffingen, Switzerland) and all lipids from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Imipenem and meropenem were purchased from Sequoia Research Products (Pangbourne, United Kingdom).

Antibiotic Susceptibility Tests. The MIC values were determined in triplicate by a standard 2-fold broth dilution method according to the CLSI guidelines as previously reported.¹⁶ Approximately 10⁶ cells were inoculated into 1 mL of MH broth for 18 h at 37 °C. The results were scored in micrograms per milliliter, and the susceptibility was classified according to the AntibioGram Committee of the French Society for Microbiology (<http://www.sfm-microbiologie.org/>). The bacterial strains were tested against different antibacterial drugs of different classes, among which imipenem (Tienam) and meropenem (Merrem) were obtained from Merck Sharp & Dohme and AztraZeneca (Paris, France), respectively.

Expression and Purification of *P. stuartii* Porins.

Expression and extraction of *Providencia* porins were conducted as previously described with minor modifications.^{16,21} Briefly, expression vector pGompPst1 harboring the *ompPst1* gene with the signal sequence was electroporated into *Escherichia coli* BL21(DE3) omp8.¹⁶ Cells were grown in LB broth substituted with 100 µg/mL ampicillin and 30 µg/mL kanamycin. At the exponential phase, the cell culture was induced for 6 h with 0.4 mM IPTG. The cell suspension was harvested using Sorval centrifugation at 10000 rpm for 30 min at 4 °C. The cell pellet was then washed with 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) and disrupted twice with a French press technique using an EmulsiFlex-C3 high-pressure homogenizer (Avestin Europe, Mannheim, Germany). The membrane pellet was collected by centrifugation at 22000 rpm for 1 h after a 2% sodium dodecyl sulfate stirring treatment at 60 °C. The membrane fraction was washed twice with 0.125% octyl polyoxyethylene (octyl-POE) in 20 mM phosphate buffer followed by ultracentrifugation at 40000 rpm at 4 °C for 1 h. OmpPst1 porin was extracted with 3% octyl-POE in 20 mM phosphate buffer followed by an ultracentrifugation step at 20 °C. The extracted porins were concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore) with the molecular cutoff at 30K Da. The buffer was exchanged with 1% octyl-POE in a final porin dilution for bilayer measurements.

Conductance Measurements. Planar lipid bilayers were formed according to the monolayer technique of Montal and Mueller.²² The bilayer is formed by two monolayers juxtaposed and extended across a hole that is 50–100 µm in diameter in a 25 µm thick polytetrafluoroethylene (PTFE) film. Prior to bilayer membrane formation, the aperture is prepacked with 1 µL of a 1% solution of *n*-hexadecane in *n*-hexane to make it lipophilic. After being dried for 10 min, both chambers are filled with buffer [throughout 1 M KCl and 20 mM MES (pH 6)], and a lipid bilayer is prepared by spreading 1 µL of a 5 mg/mL solution of 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in a solvent mixture of *n*-pentane in the aperture. Ag/AgCl electrodes are used to detect the ionic currents. The electrode on the *cis* side of the cell is grounded, whereas the other one on the *trans* side is connected to the headstage of an Axopatch 200B amplifier. Purified detergent-solubilized porins (1 ng/mL) are added to the *cis* side of the chamber and inserted into the bilayer membrane by applying a 150–200 mV voltage.

Electrical recordings were made through a pair of Ag/AgCl electrodes (World Precision Instruments, Sarasota, FL), attached to an Axon Instruments 200B amplifier with a capacitive headstage, digitized by an Axon Digidata 1440A digitizer, computer controlled by Clampex 10.0 (all by Axon Instruments, Foster City, CA). The data were filtered by an analogue low-pass four-pole Bessel filter at 10 kHz and digitally sampled at 50 kHz. Data analysis was conducted with Clampfit 10.0.

Liposome Swelling Assay. OmpPst1 porin (2 mg/mL) in 1% octyl-POE is reconstituted into liposomes as described by Nikaido and Rosenberg.²⁰ *E. coli* total lipid extract is used to form liposomes; 15% dextran (MW of 40000) is used to entrap the liposomes, and size is checked using a Nano-ZS ZEN3600 zetasizer (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). Control liposomes are prepared in the same manner but without the addition of porin. The isotonic concentration is determined by diluting control and proteoliposomes made in 15% dextran in different concentrations of raffinose measured by an Osmomat 30 osmolarimeter (Gonotec, Berlin, Germany). The value obtained for the isotonic concentration of raffinose is used as an approximation to facilitate the adjustment of isotonic concentrations for different solutes. A liposome or proteoliposome solution (30 µL) is diluted into 630 µL of an isotonic test solution in phosphate buffer in a 1 mL cuvette and mixed manually. The change in absorbance at 500 nm is monitored using a Cary-Varian UV–vis spectrophotometer in the kinetic measurement mode. The swelling rates are taken as averages from at least five different sets of experiments, calculated as previously described.²⁰

RESULTS

Antibiotic Susceptibility Assays. The ability of β -lactams to traverse the outer membrane barrier via the OmpPst1 channel was initially approached using microbiological assays (MIC)¹⁶ that determine the lowest concentration of a particular antibiotic needed to inhibit the growth of bacteria. The MIC results were determined with a biological assay corresponding to the complete mechanism of antibiotic action, including (i) diffusion through the porin channel, (ii) the affinity constant for the binding site of the periplasmic target (PBP), and (iii) the inhibitory constant on the PBP. These data confirmed the involvement of OmpPst1 porin in β -lactam susceptibility.¹⁶ We further measured the activity of carbapenems by exposing *P. stuartii* ATCC 29914 bacterial cells. The MIC test of strain *P. stuartii* ATCC 29914 shows a higher MIC for imipenem and a significantly lower MIC value for meropenem given that the two molecules belong to the same carbapenem class in the β -lactam family. The test indicated a MIC value of 2 µg/mL with imipenem compared to ≤ 0.06 µg/mL with meropenem. It has been reported that carbapenems, like many other hydrophilic antibiotics, use porin channels as the intracellular influx pathway. Our previous study has confirmed that *P. stuartii* ATCC 29914 does not produce any extended β -lactamases or metallo- β -lactamases that are capable of hydrolyzing carbapenems.¹⁶ To further confirm the role of OmpPst1 in antibiotic permeation, a porin-deficient *E. coli* BL21(DE3) omp8 strain is used to express OmpPst1 porin and the MIC value is determined for carbapenems (Table S1 of the Supporting Information). The data suggested that the lower MIC value of *P. stuartii* for meropenem, as compared to that for imipenem, may be due to a faster rate of influx of meropenem across the membrane channels, thereby accelerating the

intraperiplasmic concentration of the drug and the access to the target.

Conductance Measurements. A single OmpPst1 channel was reconstituted into a planar lipid membrane and showed a single trimer channel conductance of 2.7 ± 0.3 nS in 1 M KCl as shown previously.¹⁶ In the absence of antibiotics, the ion current through the channel was stable without any modification of the flow of ions. Addition of imipenem to one or both sides of the lipid membrane caused a decrease in ionic conductance that is strongly concentration dependent. Figure 1B shows that addition of 5 mM imipenem to both sides of the chamber reduces the single-channel conductance from 2.5 to 2.2 nS. Further increasing the imipenem concentration to

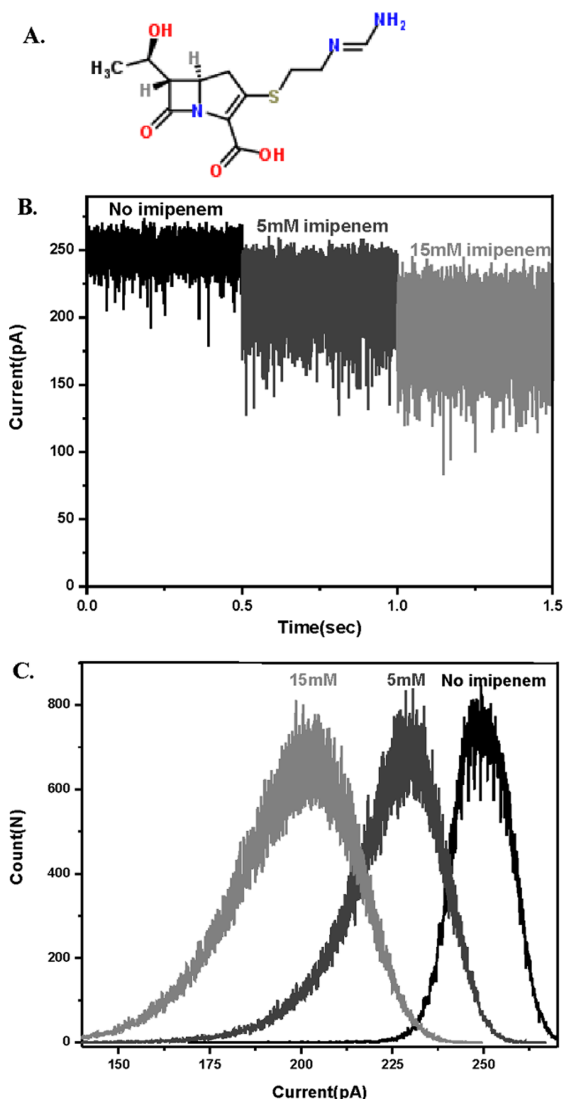


Figure 1. (A) Chemical structure of imipenem. (B) Ion current trace through a single OmpPst1 channel reconstituted into planar lipid membranes in the presence of imipenem. (C) Corresponding amplitude histogram of the OmpPst1 channel in the absence and presence of imipenem.

15 mM reduces the conductance to 2 nS at 100 mV in 1 M KCl. A corresponding amplitude histogram is shown in Figure 1C. It must be noted that the direct effect of the antibiotic in solution on the bulk conductance is negligible in the applied concentration range, i.e., up to 15 mM (Table S2 of the Supporting Information). The resolution limit of our technique indeed restricts the detection of events occurring below 100 μ s. Previous studies have shown that by lowering the temperature the kinetics of translocation slows and thus allows resolution of the translocation events. In the case of imipenem, lowering the temperature did not allow us to resolve individual translocation events even at a temperature as low as 5 $^{\circ}$ C (Figure S1 of the Supporting Information). Thus, we hypothesize that imipenem binds to the channel surface, resulting in the reduction of ion current.

In contrast, addition of meropenem to the system caused transient blockage of the ionic current (Figure 2B). At a low

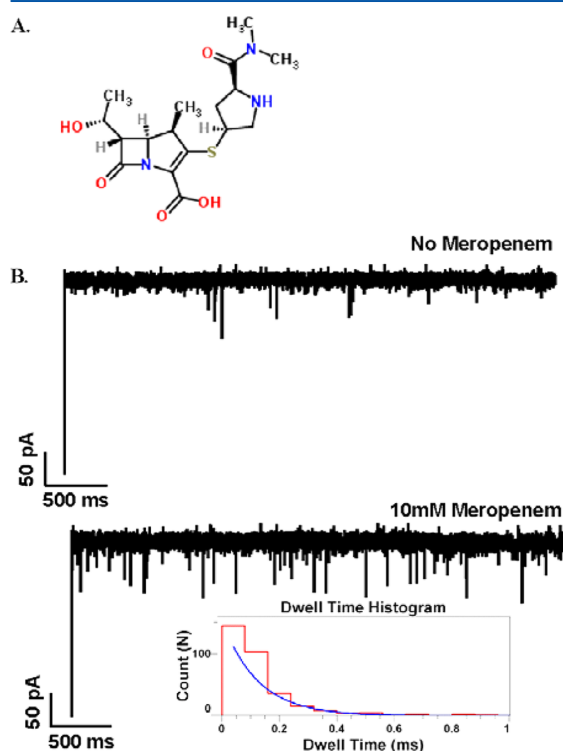


Figure 2. (A) Chemical structure of meropenem. (B) Ion current recordings through a single OmpPst1 channel in the absence of meropenem and in the presence of 10 mM meropenem added to both sides of the chamber. Conditions: 1 M KCl, 20 mM MES, pH 6, 100 mV applied voltage.

drug concentration, meropenem interacts with the OmpPst1 channel, resulting in monomer blocking. Increasing the antibiotic concentration increases the number of events. The dwell time, τ_{off} , does not depend on the concentration of the antibiotic used and was calculated to be around 150 μ s at 100 mV. Kinetic analysis of the antibiotic binding at different voltages and ionic strengths of the solution demonstrated that the interactions are of electrostatic origin. Previous studies on OmpF have revealed a charge reversion of the negatively

charged aspartic acid in the presence of multivalent cations.²³ To elucidate a similar contribution, we tested the effect of divalent and trivalent cations. The addition of 10 mM MgCl₂ in the presence of imipenem resulted in a partial closure of the channel (Figure S2 of the Supporting Information), while addition of 10 mM LaCl₃ in the presence of imipenem caused modulation of the ion current and highly resolvable blocking events (Figure 3). This is in contrast with the case for

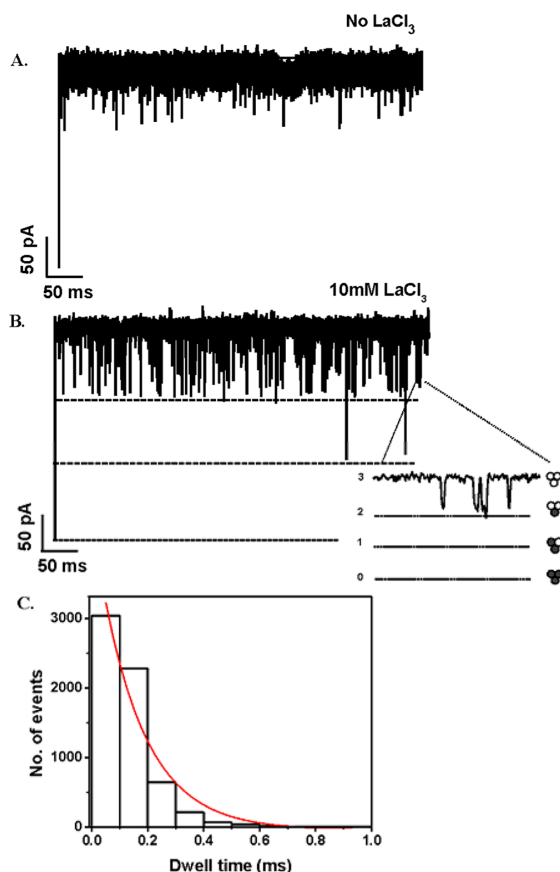


Figure 3. Ion current trace of a single OmpPst1 channel reconstituted into a bilayer in the presence of 10 mM imipenem without La³⁺ (A) and with La³⁺ (B). (C) Dwell time histogram in presence of 10 mM imipenem and LaCl₃.

meropenem, for which binding kinetics were not significantly affected in the presence of trivalent cations (Figure S3 of the Supporting Information).

The number of events and the residence time obtained from ion current blockages can be readily inserted into a simplified enzymatic model, where the channel is thought to catalyze antibiotic translocation. The association rate constant, k_{on} , gives the permeation of the antibiotic molecule from the *cis* or *trans* side to the affinity site in the channel calculated from the number of antibiotic binding events per second. The dissociation rate constant, k_{off} , gives the rate at which antibiotic molecules are released from the channel affinity site to the *cis* or *trans* aqueous phase calculated from the average residence time of antibiotic blockage^{17,23–25} (Table 1).

Table 1. Rate Constants of Entry and Exit of Carbapenems through OmpPst1

	10 mM imipenem in the presence of LaCl ₃ at 100 mV	10 mM meropenem in the presence of LaCl ₃ at 100 mV
k_{on}^a ($\times 10^3$ M ⁻¹ s ⁻¹)	9 ± 3	0.6 ± 0.2
k_{off}^b ($\times 10^3$ s ⁻¹)	10 ± 3	8 ± 1.7

^a k_{on} = (number of events per second)/(3[c]), where [c] is the antibiotic concentration. ^b k_{off} = 1/(average residence time).

Permeation Assays through Liposomes. To support the conclusion about transport from the ion current fluctuation analysis, we performed liposome swelling assays. The rate of diffusion of antibiotics through OmpPst1 is calculated by reconstituting channels in liposomes and by measuring the change in optical density in the presence of an isotonic concentration of antibiotics. A requirement to conduct a liposome swelling assay is that the molecule of interest be zwitterionic, making imipenem and meropenem suitable candidates for such measurement. To scale the flux, we first use raffinose a high-molecular weight sugar too large to diffuse through the porins and then arabinose, a small sugar that permeates through the channel. Permeation rates for different sugars are obtained together within the same batch allowing us to normalize the antibiotic diffusion values with respect to arabinose. The value obtained for arabinose, which is set to 100%, is 20% higher than that obtained for galactose and 80% higher than that for maltopentaose, confirming that the swelling rate decreases as the size of the solute increases (Figure 4).

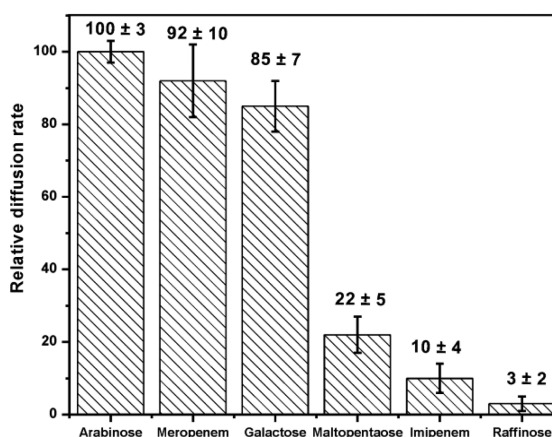


Figure 4. Relative rate of diffusion of imipenem compared to those of various sugars and meropenem through proteoliposomes. The swelling rates, which were averaged over at least three different sets of experiments, were calculated as described previously,¹² normalized by setting the rate of arabinose diffusion to 100%.

However, in the presence of imipenem, there is no significant change observed in the absorbance of proteoliposomes. The swelling rate obtained for imipenem is around 10%, i.e., comparable to that of large sugar molecules like raffinose and maltopentaose that are known to display poor or no permeation through porin channels. From the results described above, we can conclude that imipenem translocates very slowly through the OmpPst1 channel. In contrast, meropenem

showed a very high diffusion rate of around 90%, indicating it is able to translocate at a fast rate through OmpPst1. The results from liposome swelling assays thus complement the microbiological assays and bilayer measurements in suggesting poor permeation of imipenem through OmpPst1, which contrasts with the case of meropenem that translocates efficiently through the channel.

DISCUSSION

Currently, carbapenems are the most recent available β -lactams against Gram-negative bacteria. Because of their broad activity, they have become widely used in clinics; e.g., imipenem is the most used carbapenem in hospital wards. However, carbapenem efficacy is being threatened by the dissemination of bacterial resistance. During the treatment of infected patients, a correlation between the level of antibiotic resistance and the absence of porins was observed.¹¹ In *P. stuartii*, the major porin OmpPst1 provides the main pathway for the penetration of an antibiotic through the outer membrane.¹⁶ Our focus here is on the mechanism of uptake of an antibiotic through porins and its role in antibiotic resistance. In particular, we investigated the relation between pore properties, the structure of the antibiotic, and the correlation with the uptake of these molecules. Our results indicate that both imipenem and meropenem interact with OmpPst1, albeit with different binding kinetics. From the observation that imipenem reduces the channel conductance without resolvable single blocking events, we hypothesize that either imipenem translocates very fast through the channel where the time resolution of the instrument limits the visualization of well-defined events or imipenem binds to the channel, inhibiting the flow of ions and hence reducing the channel conductance. To reach further conclusions based on the observation described above, we performed temperature measurements as shown previously²⁶ to catch the fast events, but these measurements were inconclusive. To differentiate binding from translocation, a liposome swelling assay was performed that suggested low flux of imipenem in contrast to rapid permeation of meropenem. Combining single-channel measurements and liposome swelling assays, we could conclude that imipenem binds to the channel, where it may interact with side chains of amino acids present in the channel surface. Thus, imipenem can be envisaged as a plug that reduces the extent of passage of other ions.

Similar studies have shown that enrofloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, blocks the OmpF channel.²³ The interactions between the enrofloxacin and the OmpF channel wall are strong enough to close the pore for ~ 3 ms, revealing a strong affinity of the antibiotic for the channel without efficient translocation.²³ Interestingly, in the presence of magnesium chloride, the affinity of enrofloxacin for the OmpF channel was altered, as well as the orientation of the antibiotic during translocation.^{23,27} Similarly, in the case of OmpPst1, the presence of trivalent cations caused a dramatic change in the imipenem binding kinetics (Table 1). The number of imipenem blocking events increased with the increase in the antibiotic concentration, and the average residence time was calculated to be around 150 μ s. It is important to note that trivalent cations have no effect on the binding or translocation kinetics of the interaction of meropenem with OmpPst1 (Figure S3 of the Supporting Information). Kinetic constants of on and off rates for binding of imipenem and meropenem to OmpPst1 in the presence of trivalent cations are listed in Table 1.

Previously, we used homology modeling to predict the structure of the OmpPst1 channel, using as a starting model the homologous porin OmpF.¹⁶ Important differences in amino acid residues were predicted for OmpPst1, with regard to OmpF. For example, M38, which in OmpF forms an important hydrophobic pocket above the constriction region, is substituted with an aspartic acid in OmpPst1. We speculate that this specific residue modification is correlated to the reduced rate of uptake of imipenem through OmpPst1 porin. The side chain of D38 could indeed act as a sensor that recognizes and binds the exposed NH_2^+ group in the iminomethylaminoethyl strongly polar side chain of imipenem, thereby stopping its progression in the channel and conferring partial insusceptibility to *P. stuartii*. In this context, our interpretation of the effect of trivalent cations is that they reverse the charge of D38 and thereby allow the uptake of imipenem by OmpPst1. This proposition is supported by the observation that meropenem, whose side chain is a more bulky dimethylcarbomylpyrrolidinyl group, translocates through OmpPst1 and shows efficiency against *P. stuartii*.

Thus, our results highlight the importance of efficient influx through porins for β -lactams to reach their target site and provide useful information for the rational design of drugs exhibiting enhanced bacterial penetration. We show an example in which porins screen antibiotic molecules entering the channel surface and those attractive forces facilitate translocation through the channel. In addition, our study provides clues that could explain some paradoxical susceptibilities to carbapenems in other clinical isolates (Lavigne et al., unpublished results). Thus, not only the affinity of each carbapenem for its PBP target but also the efficiency of its translocation across the outer membrane participates in the regulation of the bacterial susceptibility to this class of antibiotics.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

MIC values of carbapenems against porin-deficient strain *E. coli* BL21(DE3) omp8 (Table S1), bulk conductivity of 1 M KCl (pH 6) in the absence and presence of imipenem (Table S2), ion current trace of OmpPst1 in the presence of imipenem at two different temperatures (Figure S1), ion current trace of a single OmpPst1 channel in the presence of divalent cations (Figure S2), single-OmpPst1 channel recording in the presence of meropenem and La^{3+} (Figure S3), and dwell time histogram of 10 mM meropenem in the presence of LaCl_3 (Figure S4). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*School of Engineering and Science, Research II, Jacobs University Bremen, D-28759 Bremen, Germany. E-mail: m.winterhalter@jacobs-university.de. Phone: +494212003248. Fax: +494212003249.

Funding

We are grateful for financial support through the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG WI 2278/18-1), from Jacobs University Bremen, and from COST Action BM0701. J.-P.C. is the recipient of a Young International Scientist fellowship from the Chinese Academy of Sciences.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ABBREVIATIONS

PBP, penicillin binding protein; OmpPst1, outer membrane protein Pst1; MIC, minimal inhibitory concentration.

■ REFERENCES

- (1) Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.
- (2) Hancock, R. E., and Bell, A. (1988) Antibiotic uptake into Gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 713–720.
- (3) Delcour, A. H. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1794 (5), 808–816.
- (4) James, C. E., Mahendran, K. R., Molitor, A., Bolla, J. M., Bessonov, A. N., Winterhalter, M., and Pagès, J. M. (2009) How β -lactam antibiotics enter bacteria: A dialogue with the porins. *PLoS One* 4 (5), e5453.
- (5) Simonet, V., Mallaé, M., and Pagès, J. M. (2000) Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the *Escherichia coli* OmpF channel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2), 311–315.
- (6) Jeanteur, D., Schirmer, T., Fourel, D., Simonet, V., Rummel, G., Widmer, C., Rosenbusch, J. P., Pattus, F., and Pagès, J. M. (1994) Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (22), 10675–10679.
- (7) Poole, K. (2004) Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2200–2223.
- (8) Lou, H., Chen, M., Black, S. S., Bushell, S. R., Ceccarelli, M., Mach, T., Beis, K., Low, A. S., Bamford, V. A., Booth, I. R., Bayley, H., and Naismith, J. H. (2011) Altered antibiotic transport in OmpC mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant *E. coli*. *PLoS One* 6 (10), e25825.
- (9) Penner, J. L. (2005) Genus XXX. *Providencia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner, D. J., Kreig, N. R., Staley, J. T., and Garrity, G. M., Eds.) 2nd ed., pp 753–759, Springer, New York.
- (10) Stock, I., and Wiedemann, B. J. (1998) Natural antibiotic susceptibility of *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *P. alcalifaciens* and *P. rustigianii* strains. *J. Med. Microbiol.* 47, 629–642.
- (11) Fass, R. J., Barnishan, J., and Ayers, L. W. (1995) Emergence of bacterial resistance to imipenem and ciprofloxacin in a university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 36 (2), 343–353.
- (12) Akova, M., Daikos, G. L., Tzouveleakis, L., and Carmeli, Y. (2012) Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 439–448.
- (13) Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., and Kallen, A. J. (2011) Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.* 53, 60–67.
- (14) Cornaglia, G., Giamarellou, H., and Rossolini, G. M. (2011) Metallo- β -lactamases: A last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.* 11, 381–393.
- (15) Nordmann, P., Naas, T., and Poirel, L. (2011) Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infect. Dis.* 17, 1791–1798.
- (16) Tran, Q. T., Mahendran, K. R., Hajjar, E., Ceccarelli, M., Davin-Regli, A., Winterhalter, M., Weingart, H., and Pagès, J. M. (2010) Implication of porins in β -lactam resistance of *Providencia stuartii*. *J. Biol. Chem.* 285, 32273–32281.
- (17) Nestorovich, E. M., Danelon, C., Winterhalter, M., and Bezrukov, S. M. (2002) Designed to penetrate: Time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (15), 9789–9794.
- (18) Benz, R., Schmid, A., Nakae, T., and Vos-Scheperkeuter, G. H. (1986) Pore formation by LamB of *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *J. Bacteriol.* 165 (3), 978–986.
- (19) Bangham, A. D., Hill, M. W., and Miller, N. G. A. (1974) Preparation and use of liposomes as models of biological membranes.

In *Methods in Membrane Biology* (Korn, N. D., Ed.) pp 1–68, Plenum, New York.

- (20) Yoshimura, F., and Nikaido, H. (1985) Diffusion of β -lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 (1), 84–92.
- (21) Garavito, R. M., and Rosenbusch, J. P. (1986) Isolation and crystallization of bacterial porin. *Methods Enzymol.* 125, 309–328.
- (22) Montal, M., and Mueller, P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (12), 3561–3566.
- (23) Singh, P. R., Ceccarelli, M., Lovelle, M., Winterhalter, M., and Mahendran, K. R. (2012) Antibiotic permeation across the OmpF channel: Modulation of the affinity site in the presence of magnesium. *J. Phys. Chem. B* 116 (15), 4433–4438.
- (24) Movileanu, L., Schmittschmitt, J. P., Scholtz, J. M., and Bayley, H. (2005) Interactions of peptides with a protein pore. *Biophys. J.* 89, 1030–1045.
- (25) Berezhkovskii, A. M., and Bezrukov, S. M. (2005) Optimizing transport of metabolites through large channels: Molecular sieves with and without binding. *Biophys. J.* 88, L17–L19.
- (26) Mahendran, K. R., Chimerel, C., Mach, T., and Winterhalter, M. (2009) Antibiotic translocation through membrane channels: Temperature-dependent ion current fluctuation for catching the fast events. *Eur. Biophys. J.* 38 (8), 1141–1145.
- (27) García-Giménez, E., Alcaraz, A., and Aguilera, V. M. (2010) Overcharging below the nanoscale: Multivalent cations reverse the ion selectivity of a biological channel. *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.* 81 (2), 021912.

Full Porins Channel Gating Observed by Molecular Dynamics Simulations

Wanling Song¹, Chady Nasrallah², Li Li¹, Hualiang Jiang¹, Jacques-Philippe Colletier^{2, 3, 4, *}, Yechun Xu^{1*}

¹ CAS Key Laboratory of Receptor Research, Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai 201203, China; ² CNRS, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France, ³ CEA, IBS, Grenoble, France, ⁴ Université Grenoble I, IBS, 41 rue Jules Horowitz, 38027, Grenoble, France

*To whom correspondence should be addressed. Emails: colletier@ibs.fr (J.P.C); ycxu@simmm.ac.cn (Y.X).

Abstract:

Porins are β -barrel channels on the outer membrane of Gram-negative bacteria with the extracellular loop 3 (L3) folding back into the channel. They are responsible for conducting small molecules through the lipid bilayer. Porins possess high possibility of open states yet have the capability of presenting closing states with application of voltage in electrophysiology experiments. Despite various mutations and computational works implemented on porins, the detailed gating mechanism and its physiology significance still remain inconclusive. Here we demonstrate the complete process of porins gating in atomic resolution and uncover the structural characteristics that determine the gating sensitivity by performing molecular dynamics simulations on two general diffusion porins with distinct voltage sensitivities. The simulations reveal that the L3 conformation change that resulted from ion interference is the structural origination of porin gating and the charged residues on L3 are serving as the sensors. The full gating features protrusion of the conserved aromatic residue at L3 tip. Consequently the flexibility of L3 tip is determinant to voltage sensitivity. The revelation of the process correlates the physiology significance of porin gating with regulation of solute permeation and provides a basis for understanding the bacterial antibiotics resistance originated from porin mutation.

Introduction:

Porins are intrinsically trimerized membrane proteins in the outer membrane of Gram-negative bacteria. They are the principal conduits for the passive penetration of hydrophilic

molecules, including ions, nutrients, antibiotics, *etc*^{12, 148}. Porins are divided into two classes: general diffusion porins (e.g. *Escherichia coli* OmpF¹⁴⁹, OmpC¹⁵⁰ and PhoE¹⁴⁹) and substrate-specific porins (e.g. *Escherichia coli* LamB¹⁵¹ and ScrY¹⁵²). The general diffusion class has been made the focus of porins researches due to its importance in transportation of antibiotic. General diffusion porins display a conserved 16-stranded β -barrel architecture with eight turns at the intracellular side and eight loops (L1-L8) at the extracellular side of the membrane. In particular extracellular loop L3 folds back into the pore adopting a helix-turn-loop structure and creates a narrow region coined as the “constriction zone” at mid height of the channel. The amino-acid distribution on L3 and on the β -barrel wall opposite to it (“anti-L3 region”) determines the sieving properties of porins, *i.e.* their ion specificity and size exclusion limit^{29, 153}.

Porins can switch from their open state to a variety of gated states by the application of external voltages¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. The critical voltage required for gating (V_c) varies among porins, but is generally in the order of hundreds of mV. Full gating states are characterized as step-wise long lasting closing states and can be influenced by a variety of environmental factors, including pH and salt concentration^{157, 158}, membrane constitution^{159, 160}, polarity of the transmembrane potential¹⁶¹, or the presence of such effectors as oligosaccharides¹⁵⁹ and polyamines¹⁶². Partial gating states or subconducting states are referred to a bunch of fast kinetic intermediates that are governed by short-lived conformational changes^{154, 155, 163}. The frequency of subconductance increases exponentially with temperature and is independent of salt concentration or pH conditions¹⁶³. Plenty evidences have indicated a critical role of constriction zone in the porin gating. Stabilization of L3 led to reduction in voltage sensitivity^{130, 164}. Deletion of the tip of L3 resulted in decrease in conductance and an increase in voltage sensitivity^{164, 165}. Mutagenesis of charged residues on L3 caused alteration in voltage sensitivity, channel conductance and ion selectivity¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Molecular dynamics simulations have been deployed to provide atomic insights into the gating process^{153, 163, 169-171}. In previous simulations, the flexible nature of L3 was revealed. However, a complete channel closure has not been observed yet because of the relative high gating voltage compared to the limited simulation resources. Despite all the endeavours, the detailed gating process of porins still remains unclear.

To investigate the atomic level mechanism of porin gating, we carried out voltage-applied molecular dynamics simulations on two general-diffusion porins from *Providencia stuartii*: Omp-Pst1 and Omp-Pst2¹⁷². Whereas Omp-Pst1 shows mild anion-selectivity with a critical

voltage of ~ 200 mV, Omp-Pst2 exhibits strong cation-selectivity with a critical voltage less than 40 mV, the lowest observed to date⁴⁴. During the course of 500 ns MD simulations, we observed channel closing in Omp-Pst2 at negative voltage in comparison to the high stability in Omp-Pst1. The channel closure in Omp-Pst2 arose from conformational transformation of L3 while the stable ion permeation in Omp-Pst1 stemmed from the rigidity of L3 tip. Comparison of the simulation data unveiled a direct link of L3 flexibility to gating behavior of porin and suggested a regulatory role of porin gating in bacterial homeostasis.

Results:

The structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2, embedded in a lipid bilayer and wrapped with water and ions, were subjected to two voltage conditions: $V < 0$ mV (direction of the electric potential from extracellular side to intracellular side) and $V > 0$ mV (direction of the electric potential from intracellular side to extracellular side). In addition, both porins were subjected to the same conditions without any voltages for blank control. In all simulations, the β -barrel wall remained its rigidity, showing a root-mean square fluctuation (RMSF) smaller than 0.1 nm. In contrast, the extracellular loops displayed intrinsic flexibility, which was in general magnified by the application of voltages (Supplementary Fig. S1). The ion fluxes were effectively developed under external voltages, while the ion permeations with no voltage were mostly diffusive (Supplementary Fig. S2).

During the first 100 ns of simulations, ion permeation rate remained steady in the four voltage-applied systems (Fig. 1A). In line with the experimental results, simulations indicated that Omp-Pst2 is strong cation selective and Omp-Pst1 is mild anion selective (Fig. 1B). The type of ion selectivity was decided by the overall electrostatic property (-3 e in Omp-Pst2 and $+5$ e in Omp-Pst1). However, the strength of ion selectivity was determined by the charge distribution within the constriction zone^{171, 173, 174}. In the constriction zone, a strong transverse electrostatic field was generated by a negative cluster on L3 and a positive cluster on the anti-L3 wall. In Omp-Pst2 the L3 side hosted a net charge of -5 e and the anti-L3 region $+3$ e while in Omp-Pst1 the L3 accommodated a net charge of -3 e and the anti-L3 $+6$ e (Fig. 2A and B). The electrostatic environment of Omp-Pst2 constriction zone showed strong preference to potassium ions than chloride ions, whereas that of Omp-Pst1 constriction zone displayed less difference (Fig. 2C). The cation-selectivity of Omp-Pst2 appeared ~ 2 times more pronounced at negative voltage than at positive voltage. This asymmetry in ion permeation ratio reflected the asymmetry in charge distribution along the pore. Omp-Pst2 possessed strong negatively charged extracellular loops that helped translocation of potassium

ions but repulsed chloride ions entrance. In comparison, the extracellular loops in Omp-Pst1 featured less negative charges thus less repulsive to chloride ions.

After 100 ns of simulation, we detected different levels of ion permeation decline in the three monomers of Omp-Pst2 at negative voltage. The gating events in the three monomers happened in a similar fashion but on different time scales. At the negative voltage, potassium ions flew down the channel pore of Omp-Pst2 from extracellular side to intracellular side when they met four aspartic acids: D106, D114, D117 and E119, on the L3 (Fig. 3A). The cluster of negative charges presented an attraction pool for potassium ions where the passing-by ions were detained for about 200-2000 ps before they exited the constriction zone. During the detainment, potassium ions interacted with the loop and brought in fluctuation, especially to the intrinsically flexible 112-GA-113. In monomer B, where the gating proceeded most complete, 112-GA-113 experienced the first big conformational displacement at ~115 ns (Fig. 3B). The displacement of L3 led to impediments for potassium ion permeation and exposure of the buried E258. The potassium-attraction pool consequently expanded to E258 as well as side-chain oxygen of N102, T115, N256 and N276. The enlarged attraction pool trapped more potassium ions within the region and increased the ion detainment time (Supplementary Fig. S3). The fluctuation that more ions brought in was then transmitted to an aromatic residue at the tip of L3, W111, and made it unstable (Fig. 3B). The increasing number of potassium ions held within the attraction pool also caused displacement of L3 away from the β -barrel wall and subsequently exposed D312 under the tip of L3 at 181 ns. Some portions of the potassium ion flux were accordingly re-allocated to the tip of L3 where W111 stands. The potassium ions at vicinity interacted with W111 and eventually drove W111 flip over in the channel. When W111 completed the flip-over at ~273 ns, the channel radius was narrowed down to less than 3 Å (Fig. 3C). Once flipped over, W111 together with Y99, Y95, A103, P109 and L110 formed a hydrophobic belt, which imposed an energy barrier of both hydrophobicity and steric hindrance for ion permeation. As W111 continued to stretch out in the channel lumen, it expanded gating effects to chloride permeation. After 400ns, potassium ion permeation rate in monomer B dropped to nearly 0 and chloride ion permeation rate in monomer B reduced to less than one third of the initial rate. In the two other monomers, monomer A and monomer C, the 112-GA-113 had the extracellular-toward conformational change at ~320 ns and ~250 ns respectively (Supplementary Fig. S4 and Supplementary Fig. S5). However, the W111 in the two monomers didn't start flip-over yet within the 500 ns simulation, therefore the chloride ion permeation rate in both monomers kept intact while the potassium ion permeation rate met reduction.

Electrophysiology experiments determined a gating phenomenon of voltage-dependent polarity in porins^{154, 161, 162, 175}, *i.e.* the behaviours and sensitivity of porin gating at negative and positive voltage is distinct. In line with the experimental results, the simulation of Omp-Pst2 at positive voltage showed higher stability in structure and the ion permeation rate remained steady within the course of 500 ns simulation. Simulation analysis revealed that the L3 movements still followed the same fashion as in the simulation at negative voltage, yet the timeline for the movements was postponed. In the three monomers, the conformational jump of 112-AG-113 that exposed the buried E258 happened after 300 ns and W111 still stayed in place, *i.e.* in the vicinity of Y20, K314 and L334 side chains, at the end of the simulations (Supplementary Fig. S6). According to the simulation, the primary cause of the gating polarity phenomenon arose from the hydrogen bond network differences between the two directions of voltages. Nearly all the negatively charged residues on L3 formed more stable hydrogen bonds at positive voltage than at the other direction due to the residue orientation change (Fig. 4A and B). The stronger hydrogen bond network at positive voltage fastened the L3 and built up resistance to voltage. In particular were the three negatively charged residues on L3 loop: D114, D117 and E119. D114 almost free at negative voltage was driven intracellular-oriented at positive voltage and formed a stable hydrogen bond with Y294 before 112-AG-113 had the conformational jump. Similarly D117 couldn't secure any hydrogen bonds at negative voltage, but it kept steady interactions with Y95/Y99/N102 at positive voltage by positioning toward intracellular side. E119 under the positive voltage was driven close to R126 to stabilize hydrogen bonds, while under the negative voltage E119 was dragged away from R126 yet not close enough to R241 to ensure a stable bonding.

Omp-Pst1 was experimentally determined to have much higher voltage sensitivity than its analogue Omp-Pst2. In accordance with the experiment results, the 500 ns simulations on Omp-Pst1 at both directions of voltages failed to observe any major blockage of ion permeation. At negative voltage, only in monomer A 115-AG-116 underwent an extracellular-toward conformational jump at ~200 ns, while in the other two monomers (B and C) it remained stable within the 500 ns simulation (Supplementary Fig. S7). At positive voltage, 115-AG-116 in monomer A and B had the conformational jumps at ~300 ns and near end of the simulation respectively while that in monomer C remained stable. At both voltages, W114 stayed in place in all three monomers. The low sensitivity of Omp-Pst1 to voltage, compared to Omp-Pst2, can be rationalized in light of the structures. At the tip of Omp-Pst1 L3, a hydrogen bond was found between main-chain V110 and side-chain Y309, which was

further locked by a hydrogen bond network involving Q270 and S280 (Fig. 5A and B). In contrast, the tip of Omp-Pst2 L3 had virtually no hydrogen bond network with β -barrel wall apart from the conserved ones between main-chain of W111 and D321. The low energy barrier for movements made the tip of Omp-Pst2 L3 susceptible to ion interference.

The C-terminal side of L3 possesses a conserved unfolded structure and has weak interaction with other part of the protein. In the simulations without voltage application, it exhibited higher flexibility than the rest of L3 in both Omp-Pst1 and Omp-Pst2 (Supplementary Fig. S8). Such flexibility could readily be magnified by ion interference. In the simulation of Omp-Pst1 at positive voltage, we observed structural fluctuations in the C-terminal of L3 in monomer A, which led to minor decrease in ion permeation after 400 ns (Fig. 5C). The fluctuation was a manifest of high flexibility of C-terminal side of Omp-Pst1 L3 that lost the limited hydrogen bonds by alteration of two negative charges in Omp-Pst2 (D117 and E119) to two neutral ones (A120 and T122) (Fig. 5A). Here we categorized the partial gating resulted from ion interference in Omp-Pst1 as subconducting states for two reasons. Firstly the gating behavior was different from what observed in Omp-Pst2 at negative voltage in that it couldn't have the ability to fully close the channel. Secondly the displacement was generated by thermodynamic movements of ions rather than movements under the influence of charge attraction. Therefore it suited the experimental observation of temperature dependency and pH-independency¹⁶³.

Discussion:

Porins have been known to have gating phenomenon for years¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. However, the atomic-level details of the gating mechanism still remained elusive. Here we implemented molecular dynamics simulations on Omp-Psts and observed channel closure in Omp-Pst2. Integrated from our analysis of the simulations, we propose a model of porin gating in which the negatively charged residues on L3 are the voltage sensors and the protrusion of the aromatic residue at tip of L3 into the channel is the critical element. The gating process begins with the negative charges on L3, which interact directly with positive ions and deliver the energy the external voltage imposed on the ions to the L3. Once the energy goes beyond its capacity, L3 loop starts conformational displacement that is initiated by the flexible segment of GA near the tip. The displacement consecutively exposes the buried negatively charged residues on the wall and attracts more ions to this region. The fluctuation that ions bring in to the loop then transmits to an aromatic residue at the tip of L3 and eventually induces its protrusion. When the aromatic residue positions in the middle of the channel lumen, it

effectively closes the channel and blocks ion permeation by both its bulky size and high hydrophobicity.

Sequence alignment and structure analysis exposed that the critical residues involved in the gating model we propose here are well conserved among other general diffusion porins (Fig. 6A and B). In OmpC, OmpF, and PhoE, four aspartic acids prevalently reside on L3 though the total number of charged residues on it differs. Near the tip of L3 an aromatic amino acid (F118 in OmpF, F110 in OmpC and F111 in PhoE) is conservatively next to a flexible segment of GG or GA. On the β -barrel wall, two or three negatively charged residues (E296 and D312 in OmpF; E260, D299 and D315 in OmpC; E245, D283 and D299 in PhoE) were buried under the L3. The well conservation offers us the premise to expand the proposed gating model integrated from Omp-Psts to other general diffusion porins.

Comparison of the simulation results between the two Omp-Psts revealed that structure characteristics at L3 tip contribute to voltage sensitivity. The high sensitivity of Omp-Pst2 came from a very flexible L3 tip that could readily expose the conserved aromatic residue W111. In contrast, Omp-Pst1 increased L3 rigidity through structure alteration. In OmpF, OmpC and PhoE, the L3 tip presents one glutamic acid that forms hydrogen bonds with nearby tyrosines from the β -barrel wall (Fig. 6B). The flexibility similarity makes the critical voltage of the three porins closer to that of Omp-Pst1.

Our proposed gating model identified the critical role of charged residues in constriction zone as voltage sensors and helped understand the previous mutation results. Mutations of negative charges on the L3 side, including the ones on L3 (D113G¹⁷⁹, D113N, D113Q¹⁶⁶, E117C¹⁶⁴ in OmpF) and the ones on the β -barrel wall beneath L3 (D312N, E296L, E296A and E296Q in OmpF¹⁶⁴), led to increment of the voltage sensitivity due to the decreased acidity of the negative cluster and the weakened detainment ability to positive ions. In addition, the simulation results uncovered that the gating process did not require global conformational changes but relied on the protrusion of the aromatic amino acid at L3 tip. So the disulphide-bridge-tethering of L3 with the β -barrel wall¹³⁰ could not abolish the gating behaviour. However, our cautions still remained on how well the proposed gating model could suit for the typical anion selective porins. Mutations showed that the positively charged residues on the anti-L3 region are the voltage sensors in these porins¹⁶⁸.

Subconducting state is an intermediate closing state caused by fast-kinetic conformational changes. Previous electrophysiology experiments proved that weakening the hydrogen bonds on L3 (D105Q and E109Q in OmpC¹⁸⁰) could increase subconductance occurrence.

According to the simulation, C-terminal part of L3 could go through conformational fluctuation under ion interference that partially impedes ion permeation. In addition, high-frequency conformational fluctuations of extracellular loops were observed to disturb ion permeations during the simulations. The combination of experiment and simulation results suggest that the subconductance is generated by ion interference on flexible loops and the phenomenon of subconductance is inevitable and complementary to porin gating due to the structural characteristics.

What is the physiology significance of the porin gating? This is the question often asked but has not been fully answered yet in the investigation of porin gating. Our simulations revealed the L3 conformational changes generated by ion interference to be the atomic nature of porin gating. Accordingly previous verified regulatory conditions, including voltages, pH, salt concentration and temperature, influence the gating behaviour by either changing ion flux or the L3 flexibility. Based on the nature of gating occurrence, we put forward a suggestion that the porin gating is not merely a reaction to voltage but a mechanism adopted to regulate the permeant traffic within the channel. The gating mechanism proposed on ions therefore is feasible to other physiologically significant charged solute as well. When the charged permeants pass through the channel, they interact with L3. Once the permeant concentration within the channel reaches beyond its capacity, the conformational changes of L3 will be triggered and consequently the channel will be blocked. Because such charged permeant like organic nutrients, inorganic molecular have much larger size than ions, the L3 would be more sensitive to their concentration than to the ions. Porins isolated from antibiotic resistant strains adopted mutations on charged residues on either L3 or anti-L3 region¹⁸¹⁻¹⁸³. According to our simulation results, these porins could reduce the antibiotic susceptibilities through alteration of L3 stability or alteration of the transverse electrostatic field in the constriction zone.

In summary, a porin gating model that included conformational changes of L3 and protrusion of the conserved aromatic residue on the tip of L3 was proposed based on the simulation results. Based on the atomic origination of porin gating, which involved overloaded ion interactions, the suggestion was put forward that the physiology significance of porin gating is a coping mechanism for regulation of internal permeant traffic. Our understandings of porin gating mechanism and its physiology significance help decipher underlying molecular basis of bacterial resistance originated from porin mutations and shed a light on antibiotics design in the future.

Methods

System setup. The trimer structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 were taken from the crystal structures of their hexamers (PDB code 4BD5 and 3ZCK respectively). The trimer structures were inserted into a pre-equilibrated lipid bilayer, which comprises 512 dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), by a perl script InflateGRO¹⁸⁴. After the insertion 454 DMPC were kept in the final configuration with the area per lipid (APL) reaching 0.60 nm². The lipid-embedded Omp-Pst1 and Omp-Pst2 were then wrapped with 51,943 and 51,976 water molecules respectively in a cubic simulation box of 13.7 × 13.7 × 13.7 nm³. Potassium ions and chloride ions were added to the systems to reach a salt concentration of 1.0 mol/L.

Molecular dynamics simulation. Molecular dynamics simulations were performed using GROMACS 4.5 packag¹⁸⁵, with CHARMM27 force field for protein¹⁸⁶ and lipid¹⁸⁷. TIP3P model was used for water molecules. In all simulations, periodic boundary condition was used in all the directions. The electrostatic interactions were computed using the particle mesh Ewald (PME) method¹⁸⁸. A small fourierspacing of 0.11 nm was used in order to remove spurious drift in the center of mass in the system^{171, 189}. All bonds were constrained by LINCS¹⁹⁰. Simulation integration was calculated every 2 fs and the neighbor list was updated every five steps with a cut-off of 1.2 nm. The distance for the Lennard-Jones cut-off was set as 1.4 nm and the distance for the Coulomb cut-off 1.2 nm.

For both Omp-Pst1 and Omp-Pst2, the initial configurations were first optimized in energy minimization. Four steps of energy minimization were performed with stepwise restrains on heavy atoms, main chain, C α and none. The maximum force lower than 100 KJ mol⁻¹ nm⁻¹ was achieved. Both systems were then thermalized in six steps of NPT simulations with each lasting 500 ps. The temperature of the systems was gradually raised to 310K during the six steps. In the NPT simulations, solvent (water and ions), protein and lipids were each coupled to a heat bath with time constant $\tau_T = 0.1$ ps using weak temperature coupling. System pressure of 1 bar was maintained independently on x-y plane and z axis directions using semi-isotropic coupling. The compressibility was set as 4.6×10^{-5} bar⁻¹ at the two directions with time constant $\tau = 1$ ps. The systems were then subjected to another 1 ns NVT simulation at 310K. After equilibration, Omp-Pst1 system and Omp-Pst2 system were respectively coupled to two electrostatic fields to develop stable ion current: a negative field pointing from extracellular side to intracellular side and a positive field pointing from intracellular side to extracellular side. The four voltage-applied simulations were in NVT ensemble and lasted 500 ps. In addition, for blank controls the configurations of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 after equilibration were subjected to NVT simulation without external

electrostatic field for 500 ps. The production simulations of Omp-Pst1 and Omp-Pst2 with or without external electrostatic field were performed in the NVT ensemble at 310K. The voltage-applied simulations were performed for 500 ns and the no-voltage-applied simulations for 100 ns. A complete list of simulations is given in Supplementary Table S1.

Data Analysis. The ion permeations was calculated using *g_flux* tool¹⁹¹. The ion density within the channel was calculated using density calculation module in MDAnalysis tool¹⁹². All the visualizations were performed with PyMol or VMD.

References:

1. Alekshun, M.N. & Levy, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**, 1037-1050 (2007).
2. Kumar, A. & Schweizer, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews* **57**, 1486-1513 (2005).
3. Pages, J.M., James, C.E. & Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 893-903 (2008).
4. Nakae, T. Outer membrane of Salmonella. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *The Journal of biological chemistry* **251**, 2176-2178 (1976).
5. Luderitz, O. *et al.* Lipopolysaccharides: structural principles and biologic activities. *Reviews of infectious diseases* **6**, 428-431 (1984).
6. Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. & Poxton, I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4**, 837-851 (2002).
7. Nikaido, H. & Vaara, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews* **49**, 1-32 (1985).
8. Vaara, M. Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in gram-negative enteric bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**, 354-356 (1993).
9. Koebnik, R., Locher, K.P. & Van Gelder, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology* **37**, 239-253 (2000).
10. Pages, J.M. [Bacterial porin and antibiotic susceptibility]. *Medecine sciences : M/S* **20**, 346-351 (2004).
11. Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K. & Welte, W. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**, 2215-2220 (1998).
12. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **67**, 593-656 (2003).
13. Walsh, C. Where will new antibiotics come from? *Nature reviews. Microbiology* **1**, 65-70 (2003).
14. Levy, S.B. & Nelson, M. Reversing tetracycline resistance. A renaissance for the tetracycline family of antibiotics. *Advances in experimental medicine and biology* **456**, 17-25 (1998).
15. Neu, H.C. Quinolone Antimicrobial Agents. *Annu Rev Med* **43**, 465-486 (1992).
16. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* **78**, 119-146 (2009).
17. Arias, C.A. & Murray, B.E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge. *The New England journal of medicine* **360**, 439-443 (2009).

18. Alibert-Franco, S., Pradines, B., Mahamoud, A., Davin-Regli, A. & Pages, J.M. Efflux mechanism, an attractive target to combat multidrug resistant *Plasmodium falciparum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Current medicinal chemistry* **16**, 301-317 (2009).
19. Courvalin, P. New plasmid-mediated resistances to antimicrobial agents. *Archives of microbiology* **189**, 289-291 (2008).
20. Andremont, A., Gerbaud, G. & Courvalin, P. Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **29**, 515-518 (1986).
21. Courvalin, P. & Carlier, C. Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular & general genetics : MGG* **205**, 291-297 (1986).
22. Wright, G.D. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Current opinion in microbiology* **2**, 499-503 (1999).
23. Hooper, D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging infectious diseases* **7**, 337-341 (2001).
24. Nikaido, H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* **178**, 5853-5859 (1996).
25. Li, X.Z. & Nikaido, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**, 159-204 (2004).
26. Sass, H.J. *et al.* Densely packed beta-structure at the protein-lipid interface of porin is revealed by high-resolution cryo-electron microscopy. *Journal of molecular biology* **209**, 171-175 (1989).
27. Fernandez, C., Hilty, C., Wider, G., Guntert, P. & Wuthrich, K. NMR structure of the integral membrane protein OmpX. *Journal of molecular biology* **336**, 1211-1221 (2004).
28. Charbit, A. *et al.* In vivo and in vitro studies of transmembrane beta-strand deletion, insertion or substitution mutants of the *Escherichia coli* K-12 maltoporin. *Molecular microbiology* **35**, 777-790 (2000).
29. Karshikoff, A., Spassov, V., Cowan, S.W., Ladenstein, R. & Schirmer, T. Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **240**, 372-384 (1994).
30. Hasegawa, Y., Yamada, H. & Mizushima, S. Interactions of outer membrane proteins O-8 and O-9 with peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12. *Journal of biochemistry* **80**, 1401-1409 (1976).
31. Nikaido, H. & Rosenberg, E.Y. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *Journal of bacteriology* **153**, 241-252 (1983).
32. Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E. & Silhavy, T.J. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **20**, 911-917 (1996).
33. Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J. & Silhavy, T.J. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes & development* **9**, 387-398 (1995).
34. Matsubara, M., Kitaoka, S.I., Takeda, S.I. & Mizuno, T. Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by his-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **5**, 555-569 (2000).
35. Death, A., Notley, L. & Ferenci, T. Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of

- nutrient stress. *Journal of bacteriology* **175**, 1475-1483 (1993).
36. Traurig, M. & Misra, R. Identification of bacteriophage K20 binding regions of OmpF and lipopolysaccharide in Escherichia coli K-12. *FEMS microbiology letters* **181**, 101-108 (1999).
 37. Fourel, D., Mizushima, S., Bernadac, A. & Pages, J.M. Specific regions of Escherichia coli OmpF protein involved in antigenic and colicin receptor sites and in stable trimerization. *Journal of bacteriology* **175**, 2754-2757 (1993).
 38. Zhang, E. & Ferenci, T. OmpF changes and the complexity of Escherichia coli adaptation to prolonged lactose limitation. *FEMS microbiology letters* **176**, 395-401 (1999).
 39. Housden, N.G. *et al.* Directed epitope delivery across the Escherichia coli outer membrane through the porin OmpF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21412-21417 (2010).
 40. Charrel, R.N., Pages, J.M., De Micco, P. & Mallea, M. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant Enterobacter aerogenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**, 2854-2858 (1996).
 41. Bornet, C., Davin-Regli, A., Bosi, C., Pages, J.M. & Bollet, C. Imipenem resistance of enterobacter aerogenes mediated by outer membrane permeability. *Journal of clinical microbiology* **38**, 1048-1052 (2000).
 42. Simonet, V., Mallea, M. & Pages, J.M. Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the Escherichia coli OmpF channel. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 311-315 (2000).
 43. Thiolas, A., Bornet, C., Davin-Regli, A., Pages, J.M. & Bollet, C. Resistance to imipenem, cefepime, and ceftazidime associated with mutation in Omp36 osmoporin of Enterobacter aerogenes. *Biochemical and biophysical research communications* **317**, 851-856 (2004).
 44. Tran, Q.T. *et al.* Implication of porins in beta-lactam resistance of Providencia stuartii. *The Journal of biological chemistry* **285**, 32273-32281 (2010).
 45. Mirzabekov, T., Ballarin, C., Nicolini, M., Zatta, P. & Sorgato, M.C. Reconstitution of the native mitochondrial outer membrane in planar bilayers. Comparison with the outer membrane in a patch pipette and effect of aluminum compounds. *The Journal of membrane biology* **133**, 129-143 (1993).
 46. Bajaj, H. *et al.* Antibiotic uptake through membrane channels: role of Providencia stuartii OmpPst1 porin in carbapenem resistance. *Biochemistry* **51**, 10244-10249 (2012).
 47. Im, W. & Roux, B. Ion permeation and selectivity of OmpF porin: a theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *Journal of molecular biology* **322**, 851-869 (2002).
 48. Danelon, C., Suenaga, A., Winterhalter, M. & Yamato, I. Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation. *Biophysical chemistry* **104**, 591-603 (2003).
 49. O'Hara, C.M., Brenner, F.W. & Miller, J.M. Classification, identification, and clinical significance of Proteus, Providencia, and Morganella. *Clinical microbiology reviews* **13**, 534-546 (2000).
 50. Overturf, G.D., Wilkins, J. & Ressler, R. Emergence of resistance of Providencia stuartii to multiple antibiotics: speciation and biochemical characterization of Providencia. *The Journal of infectious diseases* **129**, 353-357 (1974).
 51. Tumbarello, M. *et al.* ESBL-producing multidrug-resistant Providencia stuartii infections in a university hospital. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **53**, 277-282 (2004).

52. de Champs, C. *et al.* New TEM variant (TEM-92) produced by *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 1278-1280 (2001).
53. Franceschini, N. *et al.* Ceftazidime and aztreonam resistance in *Providencia stuartii*: characterization of a natural TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase, TEM-60. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**, 1459-1462 (1998).
54. Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., Flevari, K., Tsakiri, M. & Douzinas, E.E. *Providencia stuartii* with VIM-1 metallo-beta-lactamase. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **60**, 183-184 (2007).
55. Shiroto, K. *et al.* Metallo-beta-lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. *Journal of medical microbiology* **54**, 1065-1070 (2005).
56. Hammond, M.L. Ertapenem: a Group 1 carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **53 Suppl 2**, ii7-9 (2004).
57. Plante, I., Centron, D. & Roy, P.H. An integron cassette encoding erythromycin esterase, ere(A), from *Providencia stuartii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51**, 787-790 (2003).
58. Mitsuyama, J., Hiruma, R., Yamaguchi, A. & Sawai, T. Identification of porins in outer membrane of *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* spp. and their role in outer membrane permeation of beta-lactams. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 379-384 (1987).
59. Delcour, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta* **1794**, 808-816 (2009).
60. Lee, E.H. *et al.* Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **35**, 1093-1098 (1991).
61. Bradford, P.A. *et al.* Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 563-569 (1997).
62. Tran Q-T, W.H., Winterhalter M, Pages J-M, & Davin-Regli A Clinical *Providencia stuartii* isolates are characterized by an enzymatic beta-lactam resistance and an epidemiological variability of OmpPst1 porin loops in response to antibiotic use (in preparation).
63. Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology* **11**, 1034-1043 (2009).
64. Broomfield, R.J., Morgan, S.D., Khan, A. & Stickler, D.J. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *Journal of medical microbiology* **58**, 1367-1375 (2009).
65. Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. & Lejeune, P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **181**, 5993-6002 (1999).
66. Costerton, J.W. Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents* **11**, 217-221; discussion 237-219 (1999).
67. Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M. & Harshey, R.M. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology* **182**, 6308-6321 (2000).
68. Periasamy, S. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1281-1286 (2012).

69. Bassler, C.M.W.a.B.L. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319-346 (2005).
70. Dandekar, A.A., Chugani, S. & Greenberg, E.P. Bacterial quorum sensing and metabolic incentives to cooperate. *Science* **338**, 264-266 (2012).
71. Davies, D.G. *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298 (1998).
72. Flemming, H.C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 623-633 (2010).
73. Romero, D., Aguilar, C., Losick, R. & Kolter, R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2230-2234 (2010).
74. Stewart, P.S. & Franklin, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 199-210 (2008).
75. Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. & Davies, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology* **184**, 1140-1154 (2002).
76. Schwartz, K., Syed, A.K., Stephenson, R.E., Rickard, A.H. & Boles, B.R. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS pathogens* **8**, e1002744 (2012).
77. Xavier, J.B. Social interaction in synthetic and natural microbial communities. *Molecular systems biology* **7**, 483 (2011).
78. Lawrence, D. *et al.* Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. *PLoS biology* **10**, e1001330 (2012).
79. Marrie, T.J., Nelligan, J. & Costerton, J.W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* **66**, 1339-1341 (1982).
80. Stickler, D.J. & Morgan, S.D. Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. *Journal of medical microbiology* **55**, 489-494 (2006).
81. Hoiby, N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC medicine* **9**, 32 (2011).
82. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 48-56 (2007).
83. Anderl, J.N., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 1818-1824 (2000).
84. Lewis, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 999-1007 (2001).
85. Korea, C.G., Ghigo, J.M. & Beloin, C. The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **33**, 300-311 (2011).
86. Rodrigues, L.R. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. *Advances in experimental medicine and biology* **715**, 351-367 (2011).
87. Saiman, L. *et al.* Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **290**, 1749-1756 (2003).
88. Fey, P.D. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat

- biofilm-mediated infections? *Current opinion in microbiology* **13**, 610-615 (2010).
89. Kolodkin-Gal, I. *et al.* A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell* **149**, 684-692 (2012).
 90. Kolodkin-Gal, I. *et al.* D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**, 627-629 (2010).
 91. Allison, K.R., Brynildsen, M.P. & Collins, J.J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* **473**, 216-220 (2011).
 92. Gregoriadis, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in biotechnology* **13**, 527-537 (1995).
 93. Wrigglesworth, J.M., Wooster, M.S., Elsdon, J. & Danneel, H.J. Dynamics of proteoliposome formation. Intermediate states during detergent dialysis. *The Biochemical journal* **246**, 737-744 (1987).
 94. D.S. Dimitrov, M.I.A. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **253**, 323-336 (1988).
 95. Rigaud, J.L., Pitard, B. & Levy, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1231**, 223-246 (1995).
 96. Bechinger, B. & Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1529-1539 (2006).
 97. Winterhalter, M. & Lasic, D.D. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chemistry and physics of lipids* **64**, 35-43 (1993).
 98. Rigaud, J.L., Paternostre, M.T. & Bluzat, A. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **27**, 2677-2688 (1988).
 99. Colletier, J.P., Chaize, B., Winterhalter, M. & Fournier, D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC biotechnology* **2**, 9 (2002).
 100. Tsai, F.C., Stuhmann, B. & Koenderink, G.H. Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **27**, 10061-10071 (2011).
 101. McPherson, A., Jr. Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *The Journal of biological chemistry* **251**, 6300-6303 (1976).
 102. Berger, B.W., Gendron, C.M., Robinson, C.R., Kaler, E.W. & Lenhoff, A.M. The role of protein and surfactant interactions in membrane-protein crystallization. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **61**, 724-730 (2005).
 103. Faham, S. & Bowie, J.U. Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *Journal of molecular biology* **316**, 1-6 (2002).
 104. Landau, E.M. & Rosenbusch, J.P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14532-14535 (1996).
 105. McCoy, A.J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
 106. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography* **64**, 112-122 (2008).
 107. Schneider, T.R. & Sheldrick, G.M. Substructure solution with SHELXD. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **58**, 1772-1779 (2002).

108. Sheldrick, G.M. & Schneider, T.R. SHELXL: high-resolution refinement. *Methods in enzymology* **277**, 319-343 (1997).
109. Weeks, C.M., R SnB: Applying Shake-and-Bake to Proteins. *Mol. Biophys.* (1993).
110. Adams, P.D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 213-221 (2010).
111. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **53**, 240-255 (1997).
112. Prilipov, A., Phale, P.S., Van Gelder, P., Rosenbusch, J.P. & Koebnik, R. Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*. *FEMS microbiology letters* **163**, 65-72 (1998).
113. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 795--800 (1993).
114. Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H. & Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins* **23**, 318-326 (1995).
115. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**, 2126-2132 (2004).
116. Murshudov, G.N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**, 355-367 (2011).
117. Brooks, T. & Keevil, C.W. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Letters in applied microbiology* **24**, 203-206 (1997).
118. Garavito, R.M. & Rosenbusch, J.P. Isolation and crystallization of bacterial porin. *Methods in enzymology* **125**, 309-328 (1986).
119. Jensen, M.O. & Mouritsen, O.G. Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochimica et biophysica acta* **1666**, 205-226 (2004).
120. Eisele, J.L. & Rosenbusch, J.P. In vitro folding and oligomerization of a membrane protein. Transition of bacterial porin from random coil to native conformation. *The Journal of biological chemistry* **265**, 10217-10220 (1990).
121. le Maire, M., Champeil, P. & Moller, J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et biophysica acta* **1508**, 86-111 (2000).
122. Alcorn, T. & Juers, D.H. Progress in rational methods of cryoprotection in macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 366-373 (2010).
123. Nakae, T. & Nikaido, H. Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium*. Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer. *The Journal of biological chemistry* **250**, 7359-7365 (1975).
124. Simonet, V., Mallea, M., Fourel, D., Bolla, J.M. & Pages, J.M. Crucial domains are conserved in Enterobacteriaceae porins. *FEMS microbiology letters* **136**, 91-97 (1996).
125. Robinson, J.A. beta-Hairpin Peptidomimetics: Design, Structures and Biological Activities. *Accounts Chem Res* **41**, 1278-1288 (2008).
126. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10037-10041 (2001).
127. Smart, O.S., Neduvilil, J.G., Wang, X., Wallace, B.A. & Sansom, M.S. HOLE: a

- program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *Journal of molecular graphics* **14**, 354-360, 376 (1996).
128. Berkane, E. *et al.* Nanopores: maltoporin channel as a sensor for maltodextrin and lambda-phage. *Journal of nanobiotechnology* **3**, 3 (2005).
 129. Arbing, M.A. *et al.* Charged residues in surface-located loops influence voltage gating of porin from *Haemophilus influenzae* type b. *The Journal of membrane biology* **178**, 185-193 (2000).
 130. Bainbridge, G., Mobasher, H., Armstrong, G.A., Lea, E.J. & Lakey, J.H. Voltage-gating of *Escherichia coli* porin: a cysteine-scanning mutagenesis study of loop 3. *J Mol Biol* **275**, 171-176 (1998).
 131. Benz, R., Janko, K., Boos, W. & Lauger, P. Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **511**, 305-319 (1978).
 132. Brunen, M. & Engelhardt, H. Asymmetry of orientation and voltage gating of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34 in lipid bilayers. *European journal of biochemistry / FEBS* **212**, 129-135 (1993).
 133. Jeanteur, D. *et al.* Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10675-10679 (1994).
 134. Simonet, V.C., Basle, A., Klose, K.E. & Delcour, A.H. The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmpT have distinct channel properties. *The Journal of biological chemistry* **278**, 17539-17545 (2003).
 135. Maeda, S. *et al.* Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597-602 (2009).
 136. Kaufmann, T.C., Engel, A. & Remigy, H.W. A novel method for detergent concentration determination. *Biophysical journal* **90**, 310-317 (2006).
 137. Gloag, E.S. *et al.* Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 11541-11546 (2013).
 138. Mattick, J.S. Type IV pili and twitching motility. *Annual review of microbiology* **56**, 289-314 (2002).
 139. Ng, W.L. & Bassler, B.L. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics* **43**, 197-222 (2009).
 140. Wiltzius, J.J. *et al.* Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nature structural & molecular biology* **16**, 973-978 (2009).
 141. Sawaya, M.R. *et al.* Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453-457 (2007).
 142. Thompson, M.J. *et al.* The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4074-4078 (2006).
 143. Liu, Y. & Kuhlman, B. RosettaDesign server for protein design. *Nucleic acids research* **34**, W235-238 (2006).
 144. Colletier, J.P. *et al.* Molecular basis for amyloid-beta polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16938-16943 (2011).
 145. Davin-Regli, A. *et al.* Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Current drug targets* **9**, 750-759 (2008).
 146. R, M.J.B. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Prokaryotes* 245-269 (2006).
 147. Ziervogel, B.K. & Roux, B. The binding of antibiotics in OmpF porin. *Structure* **21**,

- 76-87 (2013).
148. Jarosławski, S., Duquesne, K., Sturgis, J.N. & Scheuring, S. High-resolution architecture of the outer membrane of the Gram-negative bacteria *Roseobacter denitrificans*. *Molecular Microbiology* **74**, 1211-1222 (2009).
 149. Cowan, S.W. *et al.* Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**, 727-733 (1992).
 150. Baslé, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J.P. & Schirmer, T. Crystal Structure of Osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *Journal of molecular biology* **362**, 933-942 (2006).
 151. Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F. & Rosenbusch, J.P. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**, 512-514 (1995).
 152. Forst, D., Welte, W., Wacker, T. & Diederichs, K. Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat Struct Mol Biol* **5**, 37-46 (1998).
 153. Pezeshki, S., Chimere, C., Bessonov, A.N., Winterhalter, M. & Kleinekathofer, U. Understanding ion conductance on a molecular level: an all-atom modeling of the bacterial porin OmpF. *Biophys J* **97**, 1898-1906 (2009).
 154. Berrier, C., Besnard, M. & Ghazi, A. Electrophysiological Characteristics of the PhoE Porin Channel from *Escherichia coli*. Implications for the Possible Existence of a Superfamily of Ion Channels. *The Journal of membrane biology* **156**, 105-115 (1997).
 155. Mathes, A. & Engelhardt, H. Voltage-dependent closing of porin channels: analysis of relaxation kinetics. *The Journal of membrane biology* **165**, 11-18 (1998).
 156. Jones, C.M. & Taylor, D.M. Voltage gating of porin channels in lipid bilayers. *Thin Solid Films* **284-285**, 748-751 (1996).
 157. Nestorovich, E.M., Rostovtseva, T.K. & Bezrukov, S.M. Residue Ionization and Ion Transport through OmpF Channels. *Biophysical Journal* **85**, 3718-3729 (2003).
 158. Todt, J.C. & McGroarty, E.J. Acid PH decreases OMPF and OMPC channel size in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* **189**, 1498-1502 (1992).
 159. Delcour, A.H., Adler, J., Kung, C. & Martinac, B. Membrane-derived oligosaccharides (MDO's) promote closing of an *E. coli* porin channel. *FEBS Letters* **304**, 216-220 (1992).
 160. Lakey, J.H. & Pattus, F. The voltage-dependent activity of *Escherichia coli* porins in different planar bilayer reconstitutions. *European journal of biochemistry / FEBS* **186**, 303-308 (1989).
 161. Morgan, H., Lonsdale, J.T. & Alder, G. Polarity-dependent voltage-gated porin channels from *Escherichia coli* in lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1021**, 175-181 (1990).
 162. Basle, A., Iyer, R. & Delcour, A.H. Subconductance states in OmpF gating. *Biochimica et biophysica acta* **1664**, 100-107 (2004).
 163. Biro, I., Pezeshki, S., Weingart, H., Winterhalter, M. & Kleinekathofer, U. Comparing the temperature-dependent conductance of the two structurally similar *E. coli* porins OmpC and OmpF. *Biophysical journal* **98**, 1830-1839 (2010).
 164. Phale, P.S. *et al.* Voltage gating of *Escherichia coli* porin channels: role of the constriction loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6741-6745 (1997).
 165. Saint, N. *et al.* Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *The Journal of biological chemistry* **271**, 20676-20680 (1996).
 166. Phale, P.S. *et al.* Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction

- probed by mutagenesis and simulation. *Biochemistry* **40**, 6319-6325 (2001).
167. Van Gelder, P. *et al.* Voltage sensing in the PhoE and OmpF outer membrane porins of *Escherichia coli*: role of charged residues. *Journal of molecular biology* **269**, 468-472 (1997).
 168. Eppens, E.F., Saint, N., Van Gelder, P., van Boxtel, R. & Tommassen, J. Role of the constriction loop in the gating of outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **415**, 317-320 (1997).
 169. Tieleman, D.P. & Berendsen, H.J. A molecular dynamics study of the pores formed by *Escherichia coli* OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine bilayer. *Biophysical journal* **74**, 2786-2801 (1998).
 170. Im, W. & Roux, B. Ions and Counterions in a Biological Channel: A Molecular Dynamics Simulation of OmpF Porin from *Escherichia coli* in an Explicit Membrane with 1M KCl Aqueous Salt Solution. *J Mol Biol* **319**, 1177-1197 (2002).
 171. Faraudo, J., Calero, C. & Aguilera-Arzo, M. Ionic partition and transport in multi-ionic channels: a molecular dynamics simulation study of the OmpF bacterial porin. *Biophysical journal* **99**, 2107-2115 (2010).
 172. Nasrallah, C., Fenel, D., Tran, Q.-T., Song, W. & Colletier, J.-P. Amyloid-like interactions between porins provide a scaffold for biofilm formation. *to be published* (2014).
 173. Modi, N., Benz, R., Hancock, R.E.W. & Kleinekathöfer, U. Modeling the Ion Selectivity of the Phosphate Specific Channel OprP. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **3**, 3639-3645 (2012).
 174. Modi, N. *et al.* Role of the Central Arginine R133 toward the Ion Selectivity of the Phosphate Specific Channel OprP: Effects of Charge and Solvation. *Biochemistry* (2013).
 175. Samartzidou, H. & Delcour, A.H. *E. coli* PhoE porin has an opposite voltage-dependence to the homologous OmpF. *The EMBO journal* **17**, 93-100 (1998).
 176. Benz, R., Schmid, A. & Hancock, R.E. Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *Journal of bacteriology* **162**, 722-727 (1985).
 177. Delcour, A.H. Solute uptake through general porins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **8**, d1055-1071 (2003).
 178. Liu, N. & Delcour, A.H. The spontaneous gating activity of OmpC porin is affected by mutations of a putative hydrogen bond network or of a salt bridge between the L3 loop and the barrel. *Protein engineering* **11**, 797-802 (1998).
 179. Lou, K.L. *et al.* Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. I. Crystallographic analysis. *The Journal of biological chemistry* **271**, 20669-20675 (1996).
 180. Liu, N., Samartzidou, H., Lee, K.W., Briggs, J.M. & Delcour, A.H. Effects of pore mutations and permeant ion concentration on the spontaneous gating activity of OmpC porin. *Protein engineering* **13**, 491-500 (2000).
 181. Low, A.S., MacKenzie, F.M., Gould, I.M. & Booth, I.R. Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Molecular microbiology* **42**, 619-630 (2001).
 182. Mallea, M. *et al.* Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* **144**, 3003-3009 (1998).
 183. Baslé, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J.P. & Schirmer, T. Crystal Structure of Osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *Journal of molecular biology* **362**, 933-942 (2006).
 184. Kandt, C., Ash, W.L. & Tieleman, D.P. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods* **41**, 475-488 (2007).

185. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**, 435-447 (2008).
186. MacKerell, A.D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B* **102**, 3586-3616 (1998).
187. Klauda, J.B. *et al.* Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *The journal of physical chemistry B* **114**, 7830-7843 (2010).
188. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics* **98**, 10089 (1993).
189. Aksimentiev, A. & Schulten, K. Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophysical journal* **88**, 3745-3761 (2005).
190. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J. & Fraaije, J.G. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry* **18**, 1463-1472 (1997).
191. Beckstein, O. & Sansom, M.S.P. The influence of geometry, surface character, and flexibility on the permeation of ions and water through biological pores. *Physical Biology* **1**, 42 (2004).
192. Michaud-Agrawal, N., Denning, E.J., Woolf, T.B. & Beckstein, O. MDAAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* (2011).

Acknowledgements:

This study was supported by the “100 Talents Project” of the Chinese Academy of Sciences (CAS) (to Y.X.), the International Young Researcher fellowship of CAS (to J.P.C), and the National Natural Science Foundation of China (No. 31150110578, No. 21172233 and No. 91013010). Computational resources were supported by the National Supercomputing Center in Tianjin (Tianhe-1), the Computer Network Information Center (CNIC) of CAS, and Shanghai Supercomputing Center (SCC). Financial support by the CEA, the CNRS and the UJF is also acknowledged.

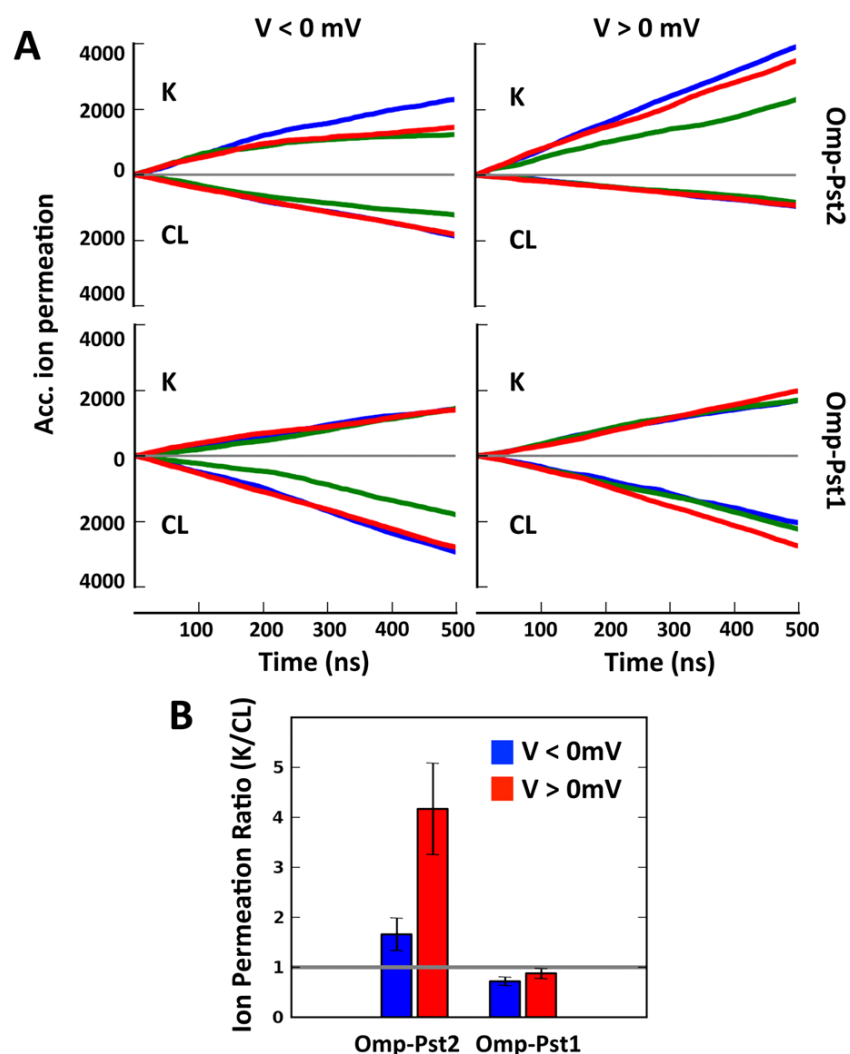


Figure 1. Ion permeation and Ion selectivity. A) Accumulative ion permeation number of Omp-Pst2 and Omp-Pst1 at both negative voltage and positive voltage. In each panel, blue, green and red lines represent the values in monomer A, B and C, respectively. B) Ion permeation ratio (K/CL) in Omp-Pst2 and Omp-Pst1 at both voltages. The values were calculated from permeation numbers in the first 100 ns simulations.

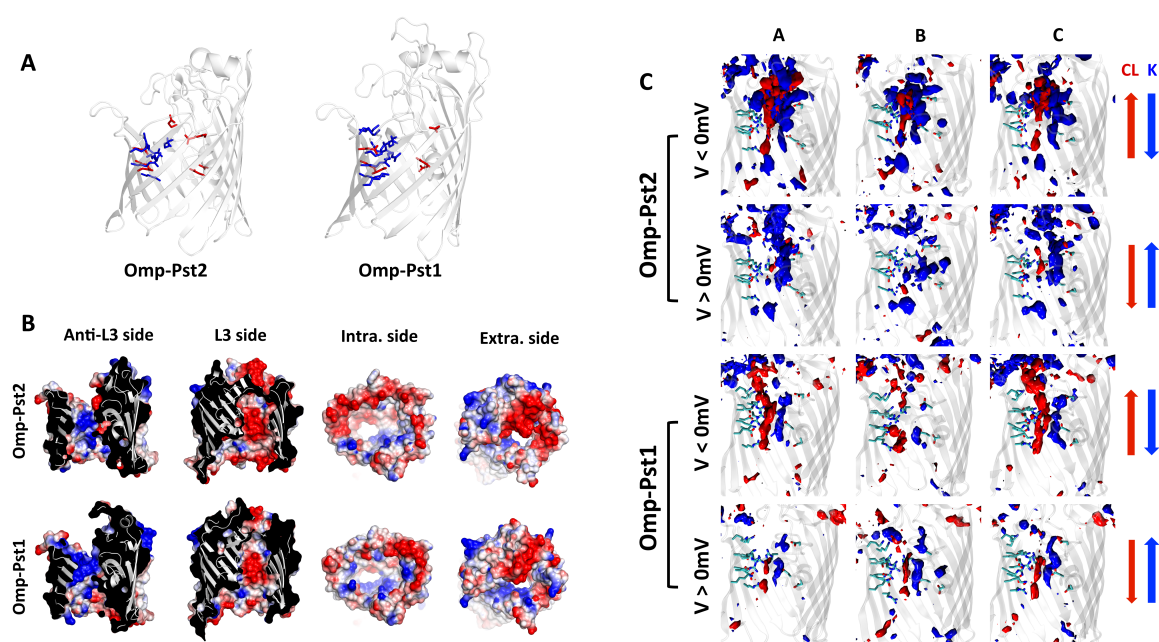


Figure 2. Electrostatic properties of Omp-Pst2 and Omp-Pst1. A) Charge distribution within the constriction zone. The negatively charged residues are shown in red sticks and the positively charged residues in blue sticks. B) Electrostatic surface. The contour color is set as ± 100 kT/e. C) Ion density maps within the channel. The ion density was averaged from the first 100 ns simulations. The red and blue contour surfaces represent the chloride ions density and the potassium ions density of 0.003 \AA^{-3} respectively. Each β -barrel represents one of the three monomers.

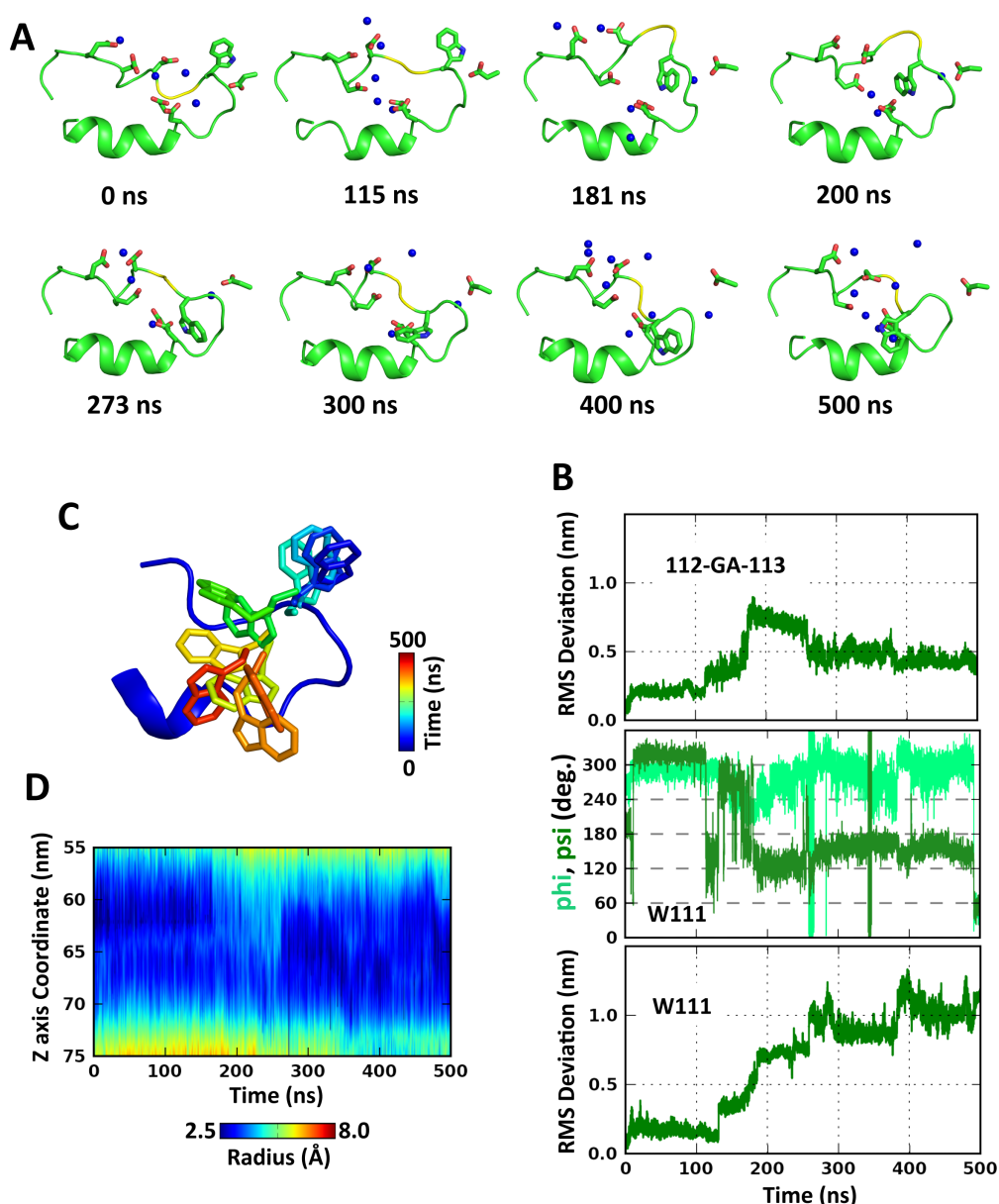


Figure 3. Gating process in Omp-Pst2 monomer B at negative voltage. A) Snapshots of L3. D106, W111, D114, D117, E256 and D312 are shown in sticks and potassium ions within 5 Å of L3 in blue spheres. 112-GA-113 is highlighted in yellow. B) The sequential movements of 112-GA-113 and W111. Upper panel is the RMSD of 112-GA-112. Middle panel is phi/psi angle of W111. Lower panel is the RMSD of W111. C) W111 movements. 103A-116M in 0 ns is shown in cartoon. Conformations of W111 are taken out every 50 ns and are shown in sticks. D) Radius heat map. The maximum contour value and minimum contour value are set as 2.5 and 8.0 Å respectively. The map is interpolated by Gaussian interpolation.

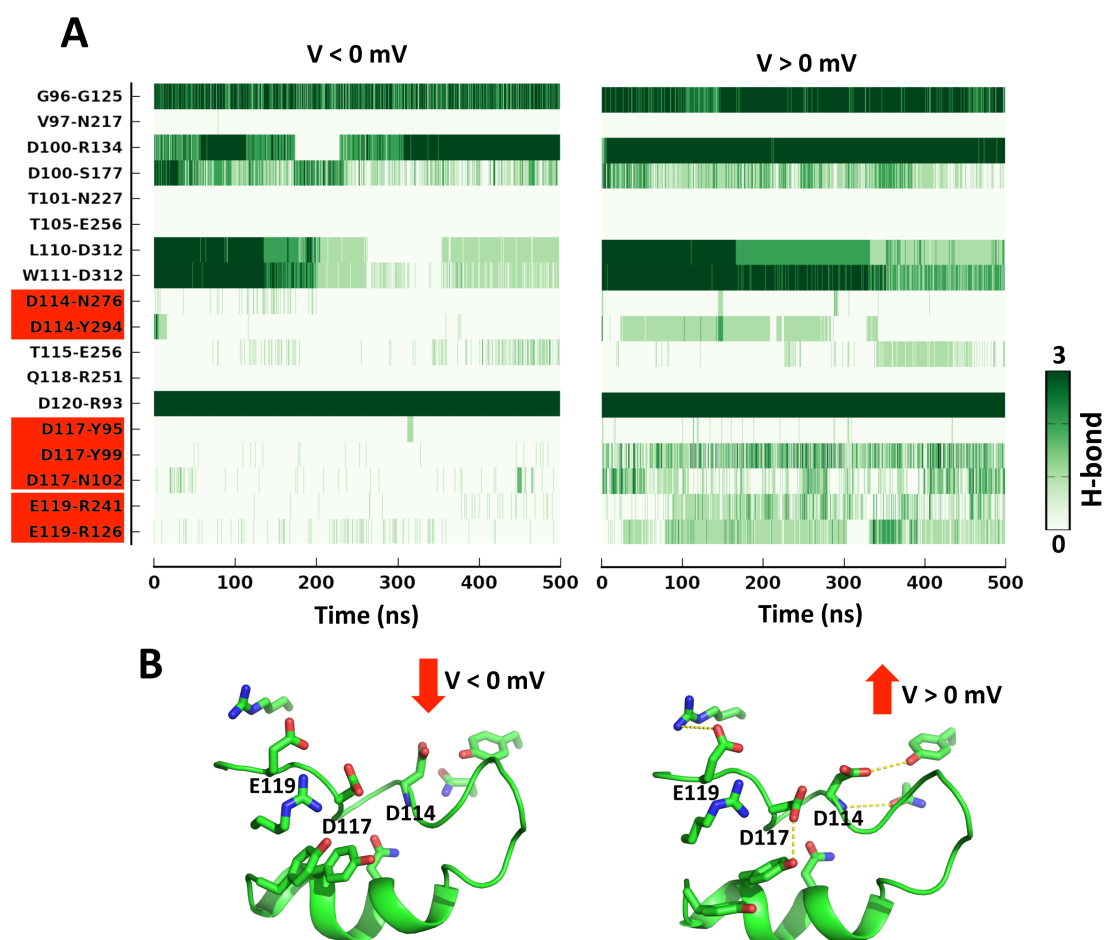


Figure 4. Different interaction networks at two voltage directions in Omp-Pst2. A) Hydrogen bonds of L3 at different voltages. The hydrogen bonds of the three negatively charged residues, D114, DD117 and E119, are highlighted in red. B) Snapshots of L3 at 200 ns at two voltages. D114, D117 and E119 and the residues with which the three negatively charged residues interact are shown in sticks.

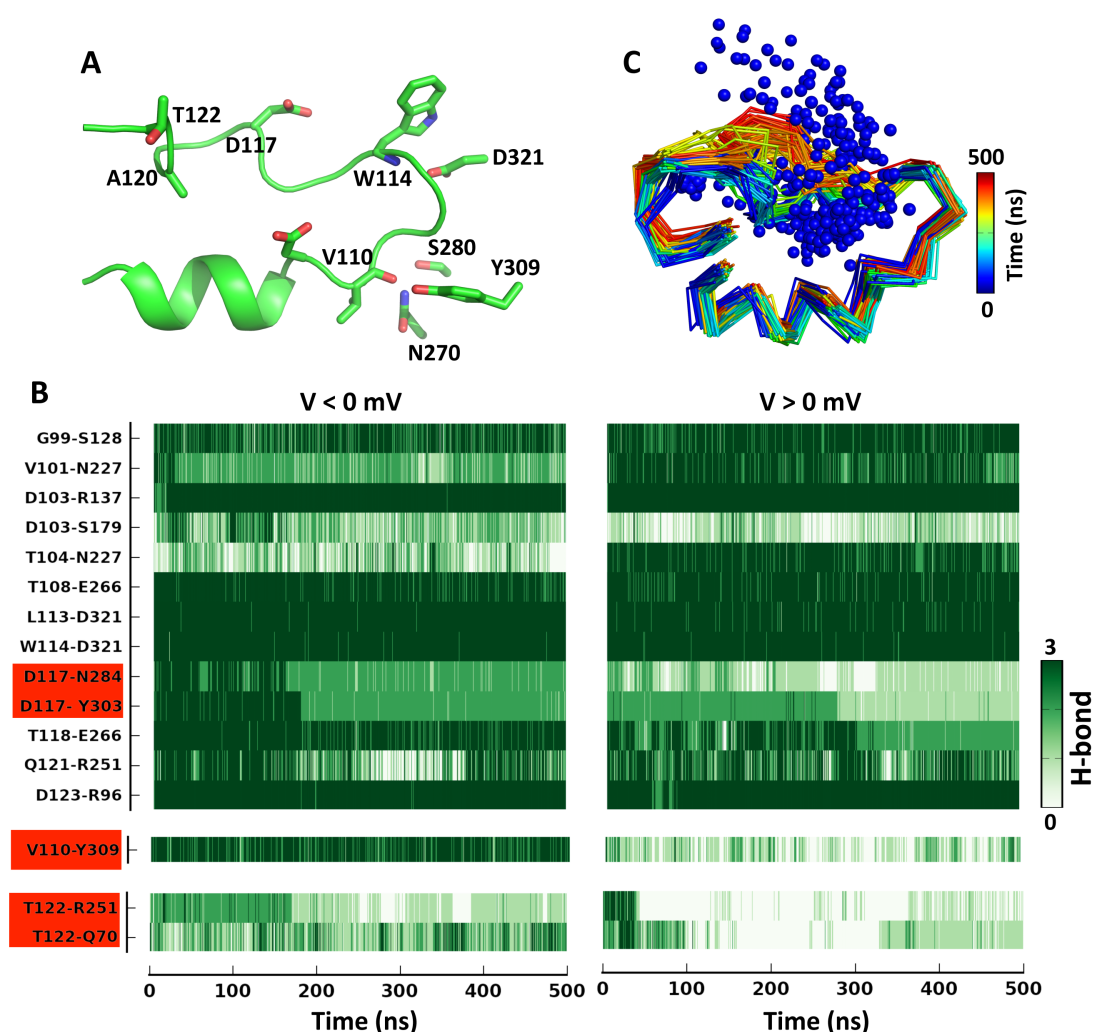


Figure 5. High stability and subconductance in Omp-Pst1. A) Structure of Omp-Pst1 L3. Residues D109, V110, W114, D117, A120, T122, N270, S280 and Y309 are shown in sticks. B) Hydrogen bonds analysis on Omp-Pst1 L3 at two voltages. Hydrogen bonds of D117 and T122 are highlighted. The hydrogen bond V110-Y309, which stabilizes the L3 tip, is also highlighted. C) Snapshots of Omp-Pst1 L3 in monomer A at positive voltage. L3 is shown in ribbon and potassium ions within 4 Å of L3 in blue spheres.

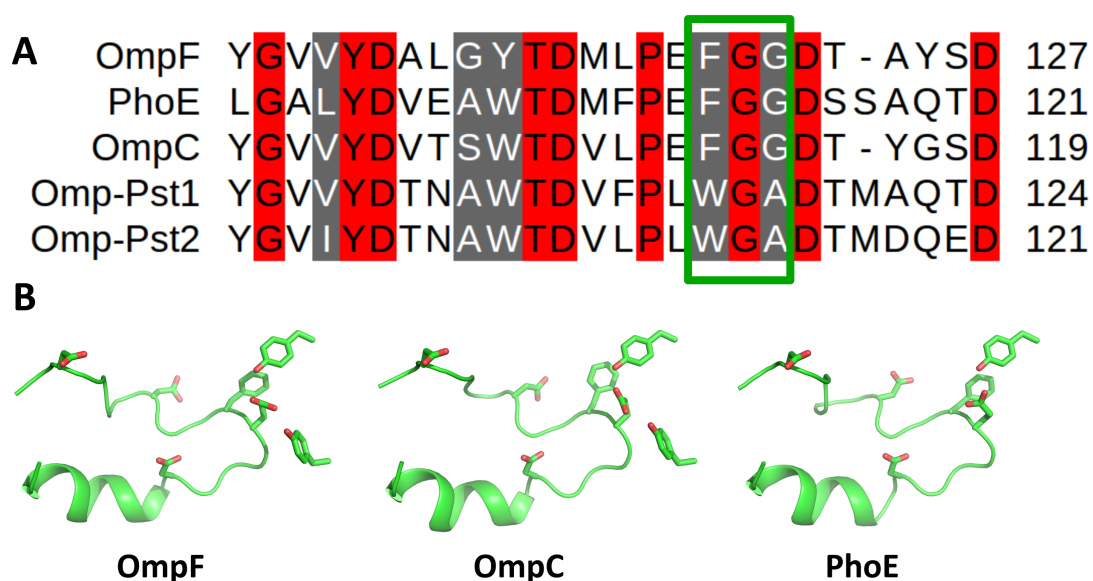


Figure 6. Sequence and structure conservation in the general diffusion porins. A) Sequence alignment of OmpF, PhoE, OmpC, Omp-Pst1 and Omp-Pst2. Identical residues are highlighted in red and similar residues in gray. The conserved aromatic residue at L3 tip and the following GA/GG segment are labeled out in green. B) The structures of L3 in OmpF, OmpC and PhoE. The conserved negatively charged residues on L3 and the conserved aromatic residue at the L3 tip are shown in sticks.

Résumé

Résumé de la thèse

Les porines sont des protéines « canal » qui assurent la diffusion non-spécifique des ions et nutriments au sein des bactéries à Gram-négatif. Elles sont également la voie d'entrée des antibiotiques hydrophiles, en particulier les β -lactames. Des mutations au sein des porines, ou leur sous-expression, ont été rapportées dans de nombreux cas d'infections multi-résistantes au cours de la dernière décade, soulignant le rôle de ces protéines dans la résistance aux antibiotiques.

La première partie de ma thèse a porté sur l'étude des relations structure fonction au sein des deux porines non spécifiques de *Providencia stuartii*, Omp-Pst1 et Omp-Pst2. Il a été montré qu'Omp-Pst1 est majoritairement responsable de l'entrée des antibiotiques. Afin de comprendre comment évolue cette porine *in situ*, nous avons réalisé une étude comparative sur les variantes d'Omp-Pst1 issues de la souche sauvage et de deux isolats cliniques. Globalement, ces structures pointent vers un consensus dans l'adaptation des porines *in situ*, lequel repose sur l'accumulation de résidus chargés positivement dans les boucles extracellulaires et dans le canal. Cette observation est en accord avec les mesures de translocation effectuées à l'échelle de la porine unique, lesquelles montrent une diffusion ralentie des antibiotiques chargés négativement au travers des porines issues des isolats cliniques. Mis ensemble, nos résultats démontrent le rôle critique joué par les porines dans la résistance aux antibiotiques, lequel vise à diminuer l'influx de ces derniers tout en conservant l'habilité pour la bactérie de se nourrir.

La deuxième partie de ma thèse s'est focalisée sur une fonction inédite des porines, à savoir leur rôle dans l'association intercellulaire et la genèse de biofilms bactériens. Les porines sont généralement exprimées sous la forme de trimères fonctionnels enchâssés dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Le mécanisme d'adhésion mis en évidence par mes travaux de thèse repose sur la formation de dimères de trimères de porines, associées face à face par leurs boucles externes, grâce à une interaction de type *steric zipper*. En exploitant un large panel de méthodologies biophysiques et d'imageries, nous avons caractérisé les propriétés adhésives d'Omp-Pst1 et Omp-Pst2, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous avons également investigué le transport de petites molécules fluorescentes au travers de ces dimères de porines, afin de vérifier leur putative implication dans la communication intercellulaire. Nos résultats démontrent la capacité des porines Omp-Pst1 et Omp-Pst2 à former des jonctions intercellulaires et les suggèrent donc comme des cibles thérapeutiques prometteuses dans la lutte contre les infections bactériennes.

Résumé de la thèse en anglais

Present in the outer membrane of bacteria, porins are the main gateway for soluble molecules, such as nutrients and ions, into the bacteria. They are also the way taken by hydrophilic antibiotics to reach their targets and kill the cell. Under the strong selective pressure caused by antibiotic overuse, bacteria have evolved modified porins that are less permeable to antibiotics. Although not the only strategy developed by bacteria to survive drug treatment, it is an important factor in the spreading phenomenon of multidrug resistant infections.

In order to gain further insights into the molecular determinants of antibiotic translocation, the first part of my thesis work aimed at resolving the crystallographic structures of Omp-Pst1 and Omp-Pst2, two non-specific porins encoded in the genome of *Providencia stuartii*. This bacterial species is not very invasive and, therefore, causes endemic rather than epidemic infections. However, these infections are often fatal given the intrinsically stringent MDR phenotype of this species. It has been shown that Omp-Pst1 is the main entrance for β -lactam antibiotics. To provide structural and functional insights into the contribution of *P. stuartii* porins to antibiotic resistance phenotypes, structural analysis was undertaken, not only from the wild type strain but also from two clinical mutant strains *i.e.* Omp-Pst1-99645 and Omp-Pst1-Nea16. Mutations result in more pronounced anion selectivity due to an increased number of positively charged amino acids lining the pore and mostly in the extracellular loops in both mutants compared to the wild type. To further determine whether these mutations contributed to a decrease in antibiotic uptake, we undertook the characterization of β -lactam antibiotics transport kinetics using electrophysiology studies at the single protein level. For the zwitterionic β -lactam tested, single-molecule conductance measurements evidenced a decrease in the association rate constant, in both mutants compared to the wild type. However, we observed instead an increase in these values for the negatively charged β -lactam, which is in good agreement with our structure-based analysis. All together, our results point towards porins playing a major role in the antibiotic resistance mechanism by reducing drug uptake.

In the second part of my thesis work, we discovered that porins could self-associate to form adhesive junctions between two cells and could provide the initial scaffold for the establishment of biofilms at early stages of their development. The self-matching interaction is mediated by a steric zipper interaction and involves their extracellular loops. In order to confirm the adhesive properties of porins, we exploited a large panel of biophysical and imaging methods both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we studied their diffusive properties in reconstituted liposomes, to explore whether these self-matching interactions between porins could play a role in cell-to-cell communication. Our results point at a major role of *P. stuartii* porins, Omp-Pst1 and Omp-Pst2, in cell-to-cell adhesion and make them promising targets to disrupt bacterial biofilm infections.